

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**LARRY LADISLAO RAMOS PAREDES**

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS RAIZES DE  
*Lepidium meyenii* E TESTES DE ATIVIDADE INSETICIDA**

**CURITIBA**

**2009**

LARRY LADISLAO RAMOS PAREDES

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS RAIZES DE  
*Lepidium meyenii* E TESTES DE ATIVIDADE INSETICIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientadora: Prof.a Dr.a Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz

CURITIBA

2009

TERMO DE APROVAÇÃO

Larry Ladislao Ramos Paredes

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS  
DAS RAIZES DE *Lepidium meyenii* E TESTES DE ATIVIDADE  
INSETICIDA**

Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências, no programa de Pós - Graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão composta pelos professores:

A MEUS PAIS

Pelo apoio incondicional

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Ladislao e Yolanda, pelo exemplo, pelo seu amor, pelo apoio fraternal incondicional além da distancia, pela educação que me proporcionaram, e pela compreensão das minhas escolhas e da minha ausência. Aos meus irmãos, Mari, Rosmery, Jeny, Elva, Nidia, Sergio e aos meus sobrinhos, pelo apoio e amor fraternal.

Aos meus amigos no Peru que me apoiaram desde longe que me incentivaram e me mostraram o lado positivo do caminho que escolhi.

Aos meus amigos que me ajudaram, apoiaram e incentivaram; á Clary, Luzmila, Gregório, Joni, Carolina, Carla, Pepe, Daniel, Diana, Angela, Angélico, Juan Carlos, Jaime, Amira, Tina, Fernanda, Patrícia, Fabiane, Leslie, Alba, Marisa, Adelaide e Viewfried por compartilhar a amizade, estar presentes nos momentos tristes e alegres, pela companhia e ser parte da minha vida.

Aos meus professores da UNSA, especialmente aqueles que me incentivaram para a pesquisa, pela confiança, incentivo, e pela dedicação.

Ao Brasil pela oportunidade do mestrado e pela oportunidade de conhecer pessoas acolhedoras que influenciaram e influenciam na minha vida e com certeza não esquecerei.

À professora Leda por acreditar na minha capacidade, por dar-me a oportunidade para fazer o Mestrado em Bioquímica na UFPR, pela paciência, pela compreensão e pela presteza; à Marilza pelo apoio e presteza para me ajudar.

À professora Fany, pelo exemplo de uma líder, pela preocupação e atenção; à professora Joana pela ajuda e pelos abraços que me dera gratuitamente; à minha orientadora, professora Carmen, por me encaminhar quando errava por me exigir quando além do cansaço precisava trabalhar e não desistir, pela dedicação e suporte nas dúvidas.

Ao pessoal do laboratório de carboidratos vegetais a Heide, Marianna, Andréa e Lúcia pela amizade, vocês sempre prontas a ajudar-me e aconselhar-me, a responder minhas muitas perguntas; ao Ricardo, Marina, Nicole, Marília, Karen e Meire pelas risadas e conversas e pelas informações sobre o restaurante universitário a Rhayla pela ajuda no português pela amizade e pela paciência; Marianna, muito obrigado pela amizade, as conversas e as dicas de raposa.

Aos colegas do Mestrado, pelo companheirismo, pelo apoio e às dicas quando precisei, pelas conversas e conselhos, pela companhia e convivência nestes dois anos; a Dirce sempre pronta para ajudar-me, Tati generosa com seu tempo, Ricardo, Paulo por compartilhar sua experiência e disponibilidade, Anelis, Tuca e Carol pelas conversas e as cervejas nas sextas, Juliana, Arnaldo, Gustavo, Arquimedes, Micheli, Leandro e Vivian; por compartilhar seu tempo ao meu lado, pelos almoços no RU e os encontros fora da universidade.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos e não tão vizinhos, pelo auxílio, dicas, conversas e empréstimo de materiais; Lauro, Marcelo, Carolina, Diogo, Luisa, Kerly, Fernanda, Thales, Ana Helena, Andréia, Daniel, Fhernanda, Luciana, ao Diogo e ao Luciano.

Ao professor Miguel pela confiança e dicas nos momentos de dúvida, por compreender-me, pelas conversas e pelo empréstimo do coletor de frações para as cromatografias de coluna.

Ao professor Gorin pelas dicas e a ajuda com o abstrac.

À Rosane, pela disponibilidade e vontade de injetar minhas muitas amostras no GLC-MS, ao Lauro pelo análise de GLC-MS.

À Andréia e Elisângela, pelas conversas e pelas análises de GLC e HPSEC-MALLS.

À equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, pela presteza e assistência; ao Restaurante universitário pela ajuda do alimento pronto que fez poder trabalhar sem a preocupação do almoço e a janta.

Ao programa de estudantes convênio da Pós-Graduação do Brasil (PEC-PG).

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pela oportunidade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, e que de alguma forma eu tenha esquecido.

Muito obrigado.

A resposta certa, não importa nada: o essencial é que as perguntas estejam certas.

Mario Quintana

## RESUMO

A maca (*Lepidium meyenii*) é uma planta nativa do Peru, onde suas raízes são utilizadas como alimento e na medicina popular. Neste trabalho foram isolados e caracterizados os polissacarídeos da parede celular das raízes de maca. O material foi deslipidificado, inativado e tratado com  $\alpha$ -amilase e então submetido a extrações sequenciais aquosas (25 e 93°C) e alcalinas (NaOH 1M, 2M e 4M) a 25°C. Para as extrações foram utilizados dois materiais de partida: um produto comercial conhecido como “farinha de maca” e as raízes frescas após secagem e moagem. A composição de monossacarídeos neutros das frações obtidas foi determinada por GLC e o conteúdo de açúcares ácidos por método colorimétrico. Embora a composição das frações obtidas tenha sido semelhante, de uma forma geral observou-se um maior conteúdo de xilose e redução nos percentuais de glucose nas frações obtidas da “farinha de maca” quando comparada às raízes de maca, sugerindo a ocorrência de mudanças durante o processamento pós-colheita que afetam a solubilidade dos polímeros. A composição monossacarídica das frações aquosas obtidas da “farinha de maca” indicou a presença de glucanas e outros polissacarídeos ácidos. Estas frações foram submetidas a métodos cromatográficos e precipitações seletivas a fim de isolar as glucanas, entretanto, os processos utilizados não foram efetivos no fracionamento das amostras. A fração alcalina obtida com NaOH 2M correspondente a hemicelulose B apresentou uma composição monossacarídica característica de uma mistura de xiloglucana estrutural e polissacarídeos ácido, além da presença de proteína. Esta fração foi fracionada por cromatografia de troca iônica resultando em uma fração neutra e livre de proteína e uma fração ácida, heterogênea e possivelmente ligada a proteína. Análises de RMN-<sup>13</sup>C e metilação indicam que a fração neutra contém uma xiloglucana estrutural, identificada pela primeira vez em raízes. Extratos aquosos e etanólicos obtidos da “farinha de maca” foram testados quanto a sua atividade inseticida contra larvas de *Aedes aegypti*, agente causador da dengue. Os resultados preliminares indicaram que os extratos de maca poderiam ter potencial inseticida para o controle populacional de larvas de *Aedes aegypti*.

**Palavras-chave:** *Lepidium meyenii*, maca, polissacarídeos, xiloglucanas, *Aedes aegypti*.



## ABSTRACT

The maca (*Lepidium meyenii*) is a Peruvian plant, its roots being used as a food and popular medicine. In this work, we have isolated and characterized their cell-wall polysaccharides. The material was defatted, enzyme inactivated and treated with  $\alpha$ -amylase and the aqueous (25 and 93°C) and alkaline extractions sequences (1M, 2M and 4M NaOH at 25 °C). For extractions were used two materials: a commercial product known as "meal maca" and fresh roots after drying and grinding. The composition of the neutral monosaccharides obtained was determined by GLC and acidic ones colorimetrically. Although the monosaccharide composition of the fractions was similar, in general there was a higher content of xylose and a decrease of glucose in fractions obtained from the "meal maca" when compared to the roots, suggesting the occurrence of changes during post-harvest processing that affect the solubility of polymers. The monosaccharide composition of fractions obtained from aqueous "meal maca" indicated the presence of glucans and acid polysaccharides. These fractions were submitted to selective precipitation and chromatographic methods to isolate the glucans, although, the procedures were not effective in fractionation, of the samples. That obtained with alkaline 2M NaOH, corresponding to hemicellulose B, had a monosaccharide composition characteristic of a mixture of structural xyloglucan and acidic polysaccharides, besides protein. It was fractionated by ion-exchange chromatography resulting in a neutral fraction of protein and an acidic, heterogeneous fraction and possibly linked to protein. Methylation and NMR-<sup>13</sup>C analyse indicated that the neutral fraction was a structural xyloglucan, identified for the first time in roots. Aqueous and ethanol extracts from the "meal maca" were tested for their insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti*, causative agent of dengue. Preliminary results indicated that the extracts of maca could have potential insecticide activity to control the population of larvae.

**Keywords:** *Lepidium meyenii*, maca, polysaccharides, xyloglucans, *Aedes aegypti*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ASPECTO GERAL DA MACA ( <i>Lepidium meyenii</i> ).....	18
FIGURA 2 - VARIEDADES DE MACA ( <i>Lepidium meyenii</i> ) COM DIFERENTES CORES .....	19
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE CÉLULAS VEGETAIS ILUSTRANDO A DISPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR.....	22
FIGURA 4 - MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA DO TIPO I E DO TIPO II.....	24
FIGURA 5 - DIAGRAMA DE EXTRAÇÕES UTILIZADO PRA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA “FARINHA DE MACA” .....	40
FIGURA 6 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DA FRAÇÃO MFW .....	43
FIGURA 7 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DA FRAÇÃO MFWD .....	44
FIGURA 8 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DAS FRAÇÕES MFW E MFHW .....	45
FIGURA 9 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DA FRAÇÃO MFHW50 .....	46
FIGURA 10 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI/UV DA FRAÇÃO MF2B .....	47
FIGURA 11 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI/UV DA FRAÇÃO MF2BW.....	49
FIGURA 12 - ESPECTRO DE RMN-C13 DA FRAÇÃO MF2BW EM D <sub>2</sub> O A 70°C .....	50
FIGURA 13 - REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE RMN-C13 DA FRAÇÃO MF2BW.....	51
FIGURA 14 - ESPECTRO DE DEPT-135 DA FRAÇÃO MF2BW EM D <sub>2</sub> O A 70°C. ....	53

FIGURA 15 -REPRESENTAÇÃO DE UM SEGMENTO DE UMA CADEIA DE XILOGLUCANA. GLUCOSE (G), XILOSE (X), GALACTOSE (L) E FUCOSE (F).....	53
FIGURA 16 -PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI/UV DA FRAÇÃO MF2BS.....	56
FIGURA 17 -DIAGRAMA DE EXTRAÇÕES UTILIZADO PARA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS RAÍZES DE MACA.....	57
FIGURA 18 -COMPARAÇÃO DOS RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDEAS OBTIDAS A PARTIR DAS RAÍZES E DA “FARINHA DE MACA” .....	58
FIGURA 19 -COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES AQUOSAS OBTIDAS A PARTIR DAS RAÍZES E DA “FARINHA DE MACA” .....	60
FIGURA 20 -COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ALCALINAS OBTIDAS A PARTIR DAS RAÍZES E DA “FARINHA DE MACA” .....	61

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE <i>Lepidium meyenii</i> .....	18
TABELA 2 -	COMPOSIÇÃO DA RAIZ DE <i>Lepidium meyenii</i> (MACA) .....	21
TABELA 3 -	RENDIMENTO, CONTEÚDO DE AÇÚCAR TOTAL E PROTEÍNAS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DA “FARINHA DE MACA” .....	41
TABELA 4 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA “FARINHA DE MACA” .....	42
TABELA 5 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO MFHW E DAS FRAÇÕES RESULTANTES APÓS O FRACIONAMENTO COM CETAVLON .....	46
TABELA 6 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO MF2B E DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS O FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA .....	48
TABELA 7 -	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ( $\delta$ ) DA REGIÃO ANOMÉRICA DA XILOGLUCANA PRESENTE NA FRAÇÃO MF2BW, OBTIDA DA FARINHA DE MACA .....	52
TABELA 8 -	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DA RAIZ DE MACA .....	58
TABELA 9 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA RAIZ DE MACA .....	59
TABELA 10 -	QUANTIDADE DE LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> VIVAS (V) E MORTAS (M) APÓS TRATAMENTO COM EXTRATO ETANOLICO DA “FARINHA DE MACA” EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	63
TABELA 11 -	QUANTIDADE DE LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> VIVAS (V) E MORTAS (M) APÓS TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DA “FARINHA DE MACA” EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	63

TABELA 12 - CONCENTRAÇÃO LETAL (g%) DO EXTRATO AQUOSO  
DA “FARINHA DE MACA” PARA LARVAS DE *Aedes aegypti*..... 64

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BSA	Albumina de soro bovino
di	Diâmetro interno
GLC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
GLC	Cromatografia líquido-gasosa
HPSEC	Cromatografia de exclusão estérica de alta pressão
MALLS	Espalhamento de luz laser em multiângulos
MFHW	Fração obtida da “farinha de maca” por extração com água a 93°C
MFMe	Fração obtida da “farinha de maca” por extração com água-metanol
MFW	Fração obtida da “farinha de maca” por extração com água a temperatura ambiente
MF1A	Fração obtida da “farinha de maca” por extração com NaOH 1M
hemicelulose A	
MF1B	Fração obtida da “farinha de maca” por extração com NaOH 1M
hemicelulose B	
MF1D	Fração obtida da “farinha de maca” por extração com NaOH 1M
hemicelulose D	
MF2A	Fração obtida da “farinha de maca” por extração com NaOH 2M
hemicelulose A	
MF2B	Fração obtida da “farinha de maca” por extração com NaOH 2M
hemicelulose B	
MF4A	Fração obtida da “farinha de maca” por extração com NaOH 4M
hemicelulose A	
MF4B	Fração obtida da “farinha de maca” por extração com NaOH 4M
hemicelulose B	
MFWD	Fração obtida da “farinha de maca” por extração com água, sobrenadante do gelo-degelo
MFHWA	Fração obtida da “farinha de maca” por extração com água a 93°C que não precipitou com cetavlon
MFHW15	Fração obtida da “farinha de maca” por extração com água a 93°C que

precipitou com cetavlon e foi resolubilizada com NaCl 0,15M

MFHW50        Fração obtida da “farinha de maca” por extração com água a 93°C que precipitou com cetavlon e foi resolubilizada com NaCl 0,5M

MF2BW        Fração obtida da “farinha de maca” por extração com NaOH 2M hemicelulose B que foi eluída com água na cromatografia de coluna com DEAE-Trisacryl Plus M

MF2BS        Fração obtida da “farinha de maca” por extração com NaOH 2M hemicelulose B que foi eluída com solução de NaCl 0,15M na cromatografia de coluna com DEAE-Trisacryl Plus M

MRHW        Fração obtida da raiz por extração com água a 93°C

MRMe        Fração obtida da raiz por extração com água-metanol

MRW        Fração obtida da raiz por extração com água a temperatura ambiente

MR1A        Fração obtida da raiz por extração com NaOH 1M hemicelulose A

MR1B        Fração obtida da raiz por extração com NaOH 1M hemicelulose B

MR1D        Fração obtida da raiz por extração com NaOH 1M hemicelulose D

MR2A        Fração obtida da raiz por extração com NaOH 2M hemicelulose A

MR2B        Fração obtida da raiz por extração com NaOH 2M hemicelulose B

MR4A        Fração obtida da raiz por extração com NaOH 4M hemicelulose A

MR4B        Fração obtida da raiz por extração com NaOH 4M hemicelulose B

NaBH<sub>4</sub>        Boroidreto de sódio

NaN<sub>3</sub>        azida de sódio

PBS        Solução salina tamponada

RI        Índice de refração

TFA        Ácido trifluoracético

v.v<sup>-1</sup>        Volume sobre volume

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1.	<i>Lepidium meyenii</i> (MACA).....	18
2.2.	CARBOIDRATOS DE VEGETAIS SUPERIORES .....	21
2.2.1.	Parede Celular Vegetal .....	21
2.2.2.	Polissacarídeos de Raízes.....	24
2.3.	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS RELACIONADAS ÀS RAÍZES DE <i>Lepidium meyenii</i> (MACA).....	26
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
3.1.	OBJETIVO GERAL .....	29
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
4.1.	AMOSTRAS .....	30
4.2.	DESLIPIDIFICAÇÃO .....	30
4.3.	INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA .....	30
4.4.	HIDROLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO .....	30
4.5.	EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	31
4.6.	FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS .....	31
4.6.1.	Congelamento e degelo .....	31
4.6.2.	Precipitação dos polissacarídeos com base quaternária de amônio (Cetavlon) .....	32
4.6.3.	Métodos Cromatográficos .....	32
4.6.3.1.	Cromatografia de troca iônica .....	32
4.6.3.2.	Cromatografia de gel permeação .....	32
4.7.	MÉTODOS COLORIMÉTRICOS .....	33
4.8.	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSACARÍDICA .....	33
4.9.	CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA ACOPLADA A DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ LASER	



	MULTIÂNGULOS E DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (HPSEC-MALLS/RI/UV) .....	34
4.10.	ANÁLISE DE METILAÇÃO .....	34
4.11.	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE (RMN- <sup>13</sup> C) .....	35
4.12.	TESTES DE ATIVIDADE INSETICIDA .....	35
4.12.1.	Obtenção dos extratos .....	35
4.12.2.	Insetos, ovos e larvas.....	36
4.12.3.	Condições de manutenção da colônia <i>Aedes aegypti</i> Rockefeller, no laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da UFPR .....	36
4.12.4.	Avaliação da ação larvívora do extrato contra <i>Aedes aegypti</i> e análise dos resultados dos bioensaios.....	37
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
5.1.	EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE MACA ( <i>Lepidium meyenii</i> ) A PARTIR DE UMA AMOSTRA COMERCIAL DE “FARINHA DE MACA” .....	38
5.2.	EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS RAÍZES DE MACA E COMPARAÇÃO COM OS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA “FARINHA DE MACA” .....	56
5.3.	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INSETICIDA DE EXTRATOS “DA FARINHA DE MACA” ( <i>Lepidium meyenii</i> ) CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	62
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>66</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A *maca* (*Lepidium meyenii*) é uma planta nativa do Peru e suas raízes apresentam interesse econômico devido as suas propriedades medicinais e alimentícias. Desde o século XVI os nativos dos Andes centrais do Peru acreditam que o consumo da maca melhora a reprodução e revigora quem a consome (CHACON 1961; GONZÁLES, 2001). Esta planta é cultivada nas montanhas dos Andes e há séculos vem sendo utilizada pelos nativos como alimento e na medicina popular, no tratamento da anemia, tuberculose e esterilidade (CÍCERO *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2000).

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de comprovar as propriedades atribuídas à raiz de maca e alguns componentes de baixa massa molar presentes no material já foram estudados (CUI *et al.*, 2003; FURSA *et al.*, 1970; MAIER *et al.*, 1981; RONCEROS, *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2000).

As raízes de maca contêm grande quantidade de amido (PAULET; CARRASCO; SÁNCHEZ, 2006), entretanto após ampla revisão bibliográfica, não foram encontrados dados a respeito dos outros polissacarídeos presentes neste material. Neste trabalho foram isolados e caracterizados polissacarídeos da parede celular das raízes de maca (*Lepidium meyenii*).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. *Lepidium meyenii* (MACA)

*Lepidium meyenii*, popularmente conhecida por maca, é uma planta herbácea cuja classificação taxonômica está indicada na Tabela 1.

**TABELA 1.** CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE *Lepidium meyenii*

Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Magnoliopsida
Subclasse:	Dilleniidae
Ordem:	Capparales
Família:	Brassicaceae
Gênero:	<i>Lepidium</i>
Espécie:	<i>Lepidium meyenii</i> , <i>Lepidium peruvianum</i>
Nome popular:	Maca, Maca-Maca, Mayno, Ayak chichira, ayak Willku, ginseng peruano.

**FONTE:** AYAMBO-SAAVEDRA, 2006.

A maca é caracterizada pela formação de uma roseta de talos curtos e decumbentes com numerosas folhas, que crescem quase ao solo, o que lhe confere uma grande tolerância ao frio (DINI *et al.*, 1994). A figura 1 mostra o aspecto geral de uma planta de maca.

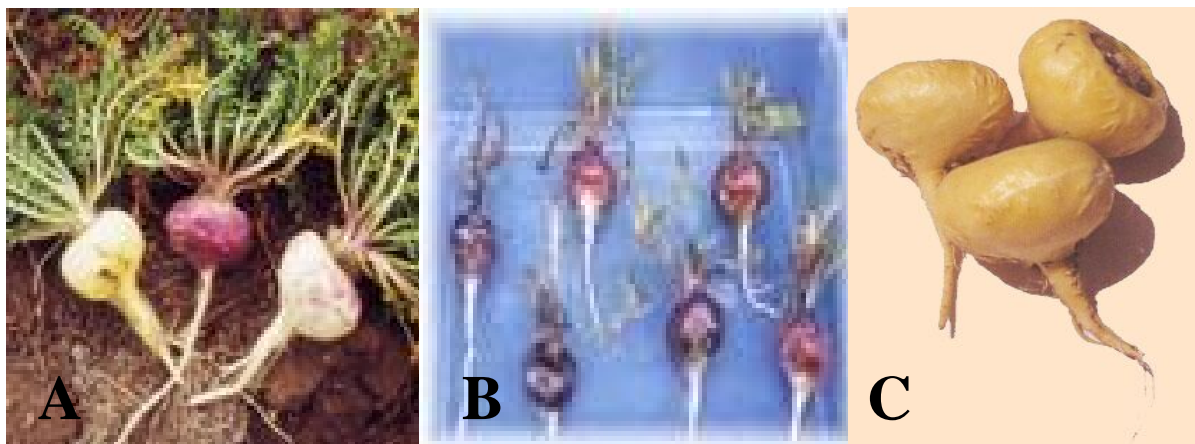


**FIGURA 1.** ASPECTO GERAL DA MACA (*Lepidium meyenii*).

**FONTE:** [www.maleenhancementpillreview.com](http://www.maleenhancementpillreview.com). Acessado em 10 de Novembro de 2008.

O órgão de reserva desta planta, que foi o objeto de estudo deste trabalho, é tuberoso, suculento e com forma de nabo. As culturas de maca se diferenciam majoritariamente pela cor dos órgãos de reserva que podem ser brancos, amarelos, cinzas, roxos, pretos, amarelo com roxo e branco com roxo. Algumas destas variedades de maca de diferentes cores estão representadas na figura 2. Alguns autores relacionam a cor do órgão de reserva com as propriedades biológicas que a maca apresenta (ALZAMORA *et al.*, 2007).

Segundo MARIN-BRAVO (2003), seria difícil dizer se o órgão de reserva da maca é uma raiz ou um tubérculo (caule subterrâneo, geralmente ovóide, com gemas ou “olhos” nas axilas de escamas ou de suas cicatrizes; dotado de reservas nutritivas) sem fazer antes um estudo adequado da ontogenia (processo de formação do órgão). Entretanto, a literatura refere-se a esta parte subterrânea da planta como raiz, e esta denominação será adotada ao longo deste trabalho.



**FIGURA 2.** VARIEDADES DE MACA (*Lepidium meyenii*) COM DIFERENTES CORES.

**FONTE:** [www.jardimdeflores.com.br](http://www.jardimdeflores.com.br); [www.aloe-info.nl](http://www.aloe-info.nl) e [www.fao.org](http://www.fao.org). Acessado em 10 de Novembro de 2008.

**A** Variedade de maca amarela, vermelha e amarela com fitas vermelhas.

**B** Variedades de maca preta e maca vermelha.

**C** Maca amarela.

A maca é a única Brassicaceae adaptada aos Andes, que tem a capacidade de se desenvolver em 3800 a 4800 metros de altitude, onde as temperaturas variam entre extremos que vão desde 18°C até -10°C num mesmo dia (ARIAS-RAMIREZ, 2002). É

cultivada nas regiões de Junin e Pasco com alta produtividade, sendo capaz de tolerar altas irradiações solares, freqüentes geadas, fortes ventos e solos ácidos ( $\text{pH} < 5$ ). Sua tolerância a condições ambientais extremas é surpreendente (CHACON DE POPOVICH, 1990) e sua adaptação é atribuída à alta produção de metabólitos secundários (CHACÓN, 1961; GONZÁLES, 2001).

A maca é a única espécie do gênero *Lepidium* cuja raiz é utilizada na alimentação, porém as folhas de outras espécies são usadas como verduras (NATIONAL RESERCH COUNCIL, 1989; ARIAS, 2002). Além disso, entre os tubérculos e raízes andinas é o que possui as melhores propriedades alimentícias. O conteúdo de aminoácidos essenciais é comparável com o recomendado pela FAO-OMS, apresentando altos percentuais de lisina, tirosina e fenilalanina. A fração lipídica contém ácido oléico e linoléico, e os níveis de minerais são elevados (DINI *et al.*, 1994; PIZZA *et al.*, 1998). Entretanto, os compostos considerados marcadores para a maca são a macaena e a macamida, ácidos graxos poli-insaturados e suas amidas, que não são encontrados em outras plantas (DINI *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 2007).

A maca também é conhecida pela sua variedade de fitoquímicos, como campesterol, stigmasterol, betasitosterol, benzil isotiocianatos, catequinas, e glucosinolatos. (CUI *et al.*, 2003; LAGARDA; GARCIA-LLATAS; FARRÉ, 2006; SANDOVAL *et al.*, 2002; ZHENG *et al.*, 2000).

A tabela 2 indica a composição das raízes de maca, onde se destaca o elevado conteúdo de carboidratos solúveis (59%) (DINI *et al.*, 1994). Entre os carboidratos solúveis encontram-se: 23,4% de sacarose, 1,6% de glucose, 4,6% de oligossacarídeos e 30,4% de polissacarídeos (WANG *et al.*, 2006).

Embora se saiba que a raiz de maca apresenta um conteúdo elevado de amido (~ 20%) (PAULET; CARRASCO; SÁNCHEZ, 2006), outros polissacarídeos de parede celular não foram descritos e foram investigados neste trabalho.

Rondan-Sanabria e Finardi-Filho (2008) estudaram as propriedades funcionais e físico-químicas do amido da maca. De acordo com esses autores, o amido de maca apresenta 20,5% de amilose e 79,5% de amilopectina, sendo a temperatura de gelatinização de 47,6°C. Devido à baixa temperatura de gelatinização e estabilidade do

gel durante a refrigeração, os autores propõem que o amido da maca pode ser empregado na indústria de alimentos refrigerados, mas não em alimentos congelados.

**TABELA 2.** COMPOSIÇÃO DA RAIZ DE *Lepidium meyenii* (MACA).

Componentes	%
Água	10,4
Proteínas	10,2
Lipídios	2,2
Carboidratos solúveis	59,0
Fibra	8,5
Cinza	4,9

**FONTE:** DINI *et al.*, 1994

## 2.2. CARBOIDRATOS DE VEGETAIS SUPERIORES

Um dos compostos orgânicos mais abundantes nos vegetais são os carboidratos, estes existem como monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados (AVIGAD; DEY, 1997).

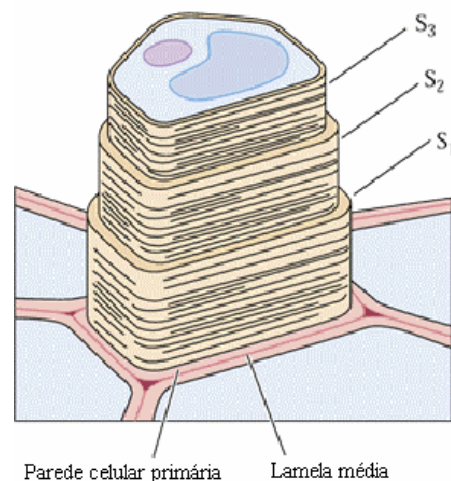
Os polissacarídeos são importantes constituintes químicos das plantas, porque são os principais componentes da parede celular (suporte estrutural para as células vegetais) (REID, 1997).

### 2.2.1. Parede Celular Vegetal

A parede celular é uma estrutura dinâmica, mecânica e biológica que se altera no decorrer da vida celular (McCANN *et al.*, 2001). Está envolvida na morfologia, crescimento e desenvolvimento das células e interações entre plantas hospedeiras e seus patógenos, além de atuar como barreira física contra microorganismos e outros agentes prejudiciais (CARPITA; Mc CANN, 2000; TALMADGE *et al.*, 1973).

Dois tipos de parede celular podem ser observadas, primária e secundária, as quais são diferenciadas por suas composições químicas e pelo período em que surgem no decorrer do desenvolvimento celular. A parede primária aparece durante a divisão

celular e aumenta sua área de superfície durante a expansão da célula. Já a parede secundária é formada internamente à primária na diferenciação, formando uma estrutura complexa adaptada à função da célula. A parede primária está presente em todas as células vegetais, enquanto a parede secundária, que se diferencia pela presença de lignina, ocorre somente em alguns tipos de células (CARPITA; Mc CANN, 2000). Observamos na figura 3 uma representação da parede celular primária e secundária (com as camadas S1, S2 e S3). A região da interfase entre duas células vizinhas é conhecida como lamela média.



**FIGURA 3.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE CÉLULAS VEGETAIS ILUSTRANDO A DISPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR.

**FONTE:** CARPITA, N; Mc CANN, M., 2000, p.54.

Em 1973, Albersheim e sua equipe introduziram pela primeira vez um modelo completo para a estrutura das paredes celulares primárias das plantas. Neste estudo foi demonstrada de forma conjunta, a interação de diferentes componentes conhecidos como: celulose, hemiceluloses, pectinas e proteínas com elementos associados, estabelecendo assim um modelo básico (ALBERSHEIM, 1975; KEEGSTRA *et al.*, 1973).

Os polissacarídeos pécticos compreendem uma família de polímeros ácidos como poligalacturonanas e ramnogalacturonanas com vários polímeros neutros como

arabinanas, galactanas e arabinogalactanas ligados (SCHOLS; VORAGEN, 1996). A lamela média é especialmente rica em pectinas (FOSKET, 1994).

As hemiceluloses são polissacarídeos que estão intimamente associados à celulose, definindo as propriedades estruturais da parede celular além de desempenhar funções na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas. As hemiceluloses incluem as xiloglucanas, glucuronoarabinoxilanas, mananas, galactomananas, glucomananas e galactoglucomananas. Nas dicotiledôneas, como a maca, a principal hemicelulose é a xiloglucana.

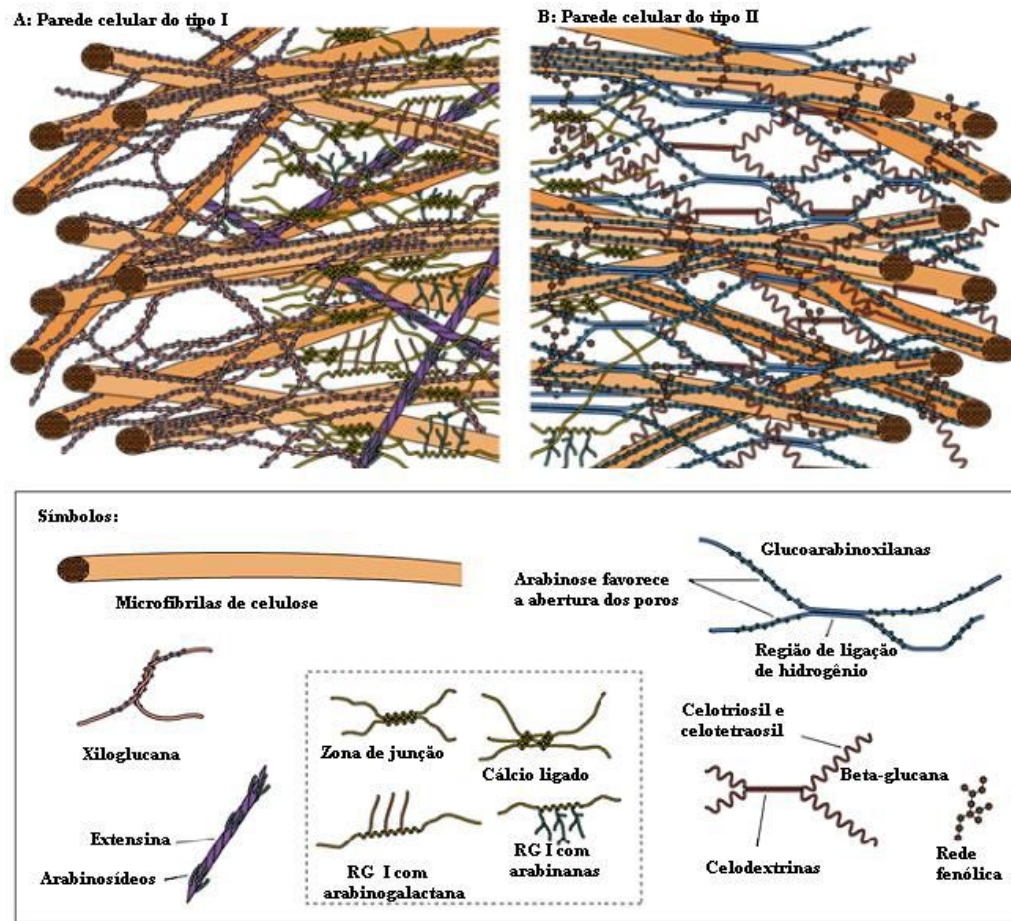
As xiloglucanas apresentam uma cadeia principal constituída por unidades de D-glucose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$ . A cadeia principal pode ser substituída em O-6 por unidades de  $\alpha$ -D-xilopiranosose, a qual também pode ser substituída em O-2 por unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose. As unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose, por sua vez, podem ser substituídas em O-2 por unidades de  $\alpha$ -L-fucose (CARPITA; McCANN, 2000; CARPITA; GIBEAUT, 1993; FRY, 1989; HAYASHI, 1989).

Carpita e Gibeaut (1993) propuseram dois tipos de estrutura para as angiospermas com base nas diferenças na quantidade de polissacarídeos pécticos e no tipo de hemicelulose principal.

O primeiro modelo, chamado de parede do tipo I, inclui a parede das espécies de dicotiledôneas em geral e algumas monocotiledôneas (não comelinóides). A parede do tipo II corresponde à parede das Poaceas e engloba a maior parte das monocotiledôneas (comelinóides).

Na parede do tipo I (figura 4), as fibras de celulose estão entrelaçadas com xiloglucanas, formando uma rede celulose-xiloglucana, que corresponde aproximadamente 50% da parede celular; esta estrutura está embebida em uma matriz de polissacarídeos pécticos: poligalacturonanas, ramnogalacturonanas I (RGI), e ramnogalacturonana II (RGII) (ALBERSHEIM *et al.*, 1996; CARPITA; GIBEAUT, 1993; SCHINDLER, 1998). Um terceiro domínio estaria formado por proteínas estruturais. A principal proteína estrutural é a extensina uma glicoproteína rica em hidroxiprolina, que pode formar pontes intermoleculares com outras proteínas sem se ligar necessariamente aos polissacarídeos (CARPITA; GIBEAUT, 1993; SHOWALTER, 1993; VARNER; LIN, 1989).





**FIGURA 4.** MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA DO TIPO I E DO TIPO II.  
**FONTE:** CARPITA, N; Mc CANN, M., 2000, p.81.

A parede celular do tipo II é composta por microfibrilas de celulose entrelaçadas por glucurarabinoxilanas (CARPITA, 1996; CARPITA; GIBEAUT, 1993). Estas formam ligações cruzadas com hidroxycinamatos e outros compostos fenólicos através de ligações éster ou éter (SCALBERT *et al.*, 1985).

### 2.2.2. Polissacarídeos de Raízes

Embora não existam muitos dados sobre polissacarídeos de raiz na literatura, alguns polissacarídeos já foram isolados e caracterizados, na maioria dos casos, as espécies estudadas eram utilizadas na medicina popular (ASSINEWE *et al.*, 2002; CAO

*et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2000; HROMÁDKOVÁ; EBRINGEROVÁ; VALACHOVI, 2002; LIU; ZHU; HUO, 2007; SHI; FU; CHEN, 2007; SONODA *et al.*, 1998; XU *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2006).

Thude e Classen (2005) isolaram e caracterizaram uma arabinana e arabinogalactana proteína (AGP) das raízes de *Echinacea pallida*. A AGP continha Gal e Ara em uma razão de 1,4:1 e 6,2% de ácidos urônicos, além de componentes minoritários como Glc e Rha. Uma arabinogalactana também foi obtida por extração aquosa a 100°C a partir das raízes de *Entada africana* (DIALLO *et al.*, 2001).

Várias glucanas, lineares e ramificadas, já foram identificadas em raízes de diferentes espécies. Cao *et al.* (2006) extraíram D-glucanas solúveis das raízes de *Angelica sinensis*. Os autores isolaram uma glucana linear ligada  $\alpha(1\rightarrow6)$  e uma glucana contendo ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$  e  $\alpha(1\rightarrow6)$  em uma razão 4:1. Uma D-glucana linear ligada  $\alpha(1\rightarrow6)$  também foi obtida das raízes de *Pueraria lobata* (CUI *et al.*, 2008).

Shi, Fu e Chen (2007) isolaram das raízes de *Cudrania tricuspidata* uma D-glucana  $\alpha(1\rightarrow4)$  com cadeias laterais de glucose terminal ligadas em O-6. A raiz de *Sophora subprostata* também contém D-glucanas  $\alpha(1\rightarrow4)$ , porém neste caso os autores verificaram as unidades da cadeia principal podiam estar substituídas nas posições O-3 e O-6. A glucana isolada de *Sophora subprostata* apresentou atividade anti-oxidante em testes *in vivo*. Das raízes da mesma espécie foi isolada uma xilana que apresentou atividade imunoestimulatória (DONG *et al.*, 1999).

Pereira *et al.* (2000) isolaram glucanas ramificadas a partir das raízes de *Periandra mediterranea*. Estes polissacarídeos apresentaram propriedades imunoestimulatórias e antiinflamatórias.

Polissacarídeos contendo Glc, Gal, Ara, Rha e Man foram obtidos por extração aquosa a quente, das raízes de *Angelica sinensis* (YANG *et al.*, 2006) e *Panax quinquefolius* (ASSINEWE *et al.*, 2002). Segundo os autores, os dois polímeros apresentaram atividade imunomodulatória nas condições testadas. Um polissacarídeo péptico obtido das raízes de *Bupleurum falcatum* também apresentou atividade imunomodulatória, aumentando a produção de interleucina-6 (GUO *et al.*, 2000).

Um polissacarídeo ácido, contendo Ara, Gal e GalA na proporção de 2,6:1:1,2 foi isolado das raízes de *Bupleurum smithii*. Em experimentos *in vitro* este polissacarídeo apresentou atividade anti-complemento (XU *et al.*, 2007).

Liu *et al.* (2007) isolaram uma galactana e uma galactomanana do extrato aquoso das raízes de *Polygonatum sibiricum*.

### 2.3. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS RELACIONADAS ÀS RAÍZES DE *Lepidium meyenii* (MACA)

As plantas produzem uma vasta e diversa quantidade de compostos orgânicos, cujas funções em muitos casos permanecem desconhecidas. Estes produtos naturais atraem a atenção devido à possibilidade de utilização como corantes, fibras, adesivos, óleos, ceras, agentes flavorizantes, medicamentos, inseticidas e herbicidas, entre outros (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; SCHÜLER, 2004).

O gênero *Lepidium* contém aproximadamente 175 espécies, as quais estão distribuídas por todo o planeta, com exceção da Antártida (MUMMERHOFF *et al.*, 1995; TOLEDO *et al.*, 1998). As espécies da Europa, Austrália e América do Norte foram extensamente estudadas, mas as espécies endêmicas dos Andes foram pouco estudadas (QUIROS, 1999). No Peru existem 11 espécies do gênero *Lepidium*, *entretanto* a que apresenta maior espectro de atividades biológicas é a maca (*Lepidium meyenii*) (CHACON DE POPOVICH, 1990; TOLEDO, *et al.*, 1998).

Pesquisas recentes com a raiz de maca abrem muitas possibilidades de uso como fonte natural para o tratamento de doenças em medicina alternativa. No mercado existem vários produtos comerciais de maca, utilizados como suplemento alimentício e como alternativa medicinal. A propriedade mais importante da maca conhecida na tradição Andina é seu efeito na fertilidade, e este fato é considerado como um dos fatores para o aumento da população nas zonas de maior altitude do Peru (SALDAÑA; CÓRDOVA; VARGAS, 2006).

Cícero *et al.* (2001) verificaram que o tratamento com maca melhora as funções sexuais em ratos. Gonzáles (2005), pesquisou a maca vermelha e constatou que esta previne o crescimento da próstata em ratos. A administração de extratos aquosos de maca vermelha por 42 dias causou a redução do tamanho ventral prostático epitelial.

Esta propriedade é atribuída ao benzilglucosinolato por induzir apoptose em células cancerígenas da próstata.

Devido ao alto teor de nutrientes presentes na maca, diversos pesquisadores investigaram o potencial uso da maca na alimentação de peixes, observando-se um aumento de 55% na taxa de sobrevivência destes; também foi observado um aumento da síntese hormonal e aumento a resistência a doenças e ao estresse (LEE *et al.*, 2004). O efeito foi atribuído a presença de quercetina e isotiocianatos (LI; AMMERMANN; QUIRÓS, 2001), glucosinolatos (PIACENTE *et al.*, 2002) e fitoestrogenos (VALENTOVA; ULRICHOVA, 2003).

Recentemente, Valentová *et al.* (2008) observaram um discreto aumento nos níveis de aspartato aminotransferase e da pressão sanguínea em voluntários utilizando 0,6g maca/dia.

Rubio *et al.* (2007) investigaram a maca preta e observaram inibição na perda de memória em ratos. Segundo os autores esta propriedade da maca pode ter uma potencial aplicação para o tratamento da doença Alzheimer.

A maca promove citoproteção em condições de estresse oxidativo (LEE *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007). Sandoval *et al.* (2001) verificaram que um extrato aquoso de maca (1mg/ml) apresentava capacidade antioxidante e citoprotetora em macrófagos RAW 264.7. Os resultados *in vitro* indicam que a maca reage com oxidantes e radicais livres, restabelecendo em 48.2% a produção de ATP; segundo eles a maca pode ajudar a manter o balanço entre oxidantes e antioxidantes.

Solis *et al.* (2006) avaliaram a capacidade da maca quanto às suas propriedades antimicrobianas. Os autores descrevem o isolamento, clonagem, caracterização, expressão e purificação de um gene de defesa (*Im-def*) da maca capaz de atuar sobre o patógeno *Phytophthora infestans* (o qual é responsável pela principal doença das culturas de batata e tomate). Os resultados obtidos indicam que a proteína NusA:Im-def em concentrações de 0,4µM inibe a *P. infestans* em 93%. Este gene de defesa é de potencial uso no desenvolvimento de uma batata transgênica resistente a essa doença.

A maca amarela é a mais explorada comercialmente, e também a mais estudada. Em um dos estudos desenvolvidos com a maca amarela, Tellez *et al.* (2002) usaram extratos de maca obtidos com pentano para avaliar a atividade fitotóxica,

cianobactericida e antitérmita. O extrato não apresentou atividade fitotóxica na condição testada ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), mas apresentou atividade cianobactericida quando testado na concentração de  $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O extrato também foi capaz de aumentar a mortalidade de térmitas (*Coptotermes formosanto*) quando comparado com o controle. Os autores determinaram que a fenilacetônitrila é o componente mais abundante do extrato. Entretanto, além deste composto foram encontrados outras 53 substâncias no mesmo extrato, os quais foram classificados quanto as suas propriedades inseticidas. Os compostos benziltiocianato e o 3-metoxifenilacetônitrila foram os compostos mais efetivos como inseticidas para *C. formosanus*, promovendo 100% de mortalidade em 48 horas (TELLEZ *et al.*, 2002). Segundo a literatura, o benziltiocianato e outros tiocianatos possuem atividade inseticida, provavelmente pela geração enzimática de cianeto de hidrogênio (BAKRY; METCALF; FUKUTO, 1968; OHKAWA *et al.*, 1972; TELLEZ *et al.*, 2002; ZSOLNAI, 1974).

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública com ampla incidência em países localizados nas áreas tropicais e subtropicais. Os metabolitos secundários das plantas têm surgido como uma possibilidade de combater o vetor, minimizando a dependência aos inseticidas químicos (organofosforados e piretróides) que levam as populações a uma intensa pressão de seleção, resultando em indivíduos resistentes (WANDSCHEER *et al.*, 2004). Considerando a ampla variedade de compostos presentes nas raízes de maca e os dados da literatura que mostram que extratos de maca podem ter atividade inseticida, neste trabalho extratos de maca foram testados quanto a sua ação contra larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus), agente causador da dengue.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar estruturalmente os polissacarídeos presentes na raiz de maca (*Lepidium meyenii*) e avaliar a capacidade inseticida de extratos da raiz contra larvas de *Aedes aegypti*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extrair os polissacarídeos presentes na raiz de maca (*Lepidium meyenii*) utilizando extrações aquosas e alcalinas.
2. Quantificar as frações extraídas quanto ao conteúdo de carboidratos e proteínas.
3. Caracterizar as frações extraídas quanto à composição monossacarídica e homogeneidade.
4. Purificar e caracterizar estruturalmente a fração polissacarídica de interesse.
5. Comparar a composição dos polissacarídeos obtidos de maca, provenientes do produto comercial conhecido como “farinha de maca” com aqueles obtidos a partir das raízes frescas.
6. Testar extratos das raízes de maca quanto a sua ação contra larvas de *Aedes aegypti*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. AMOSTRAS

Foi utilizada uma amostra comercial da raiz de maca (*Lepidium meyenii*), comercializada com o nome de “harina de Maca Santa Natura”, produto elaborado por Agroindustrias Floris S.A.C., situada na Avenida Javier Prado Oeste 1358, San Isidro (Lima 27), Peru. Esta amostra de “farinha de maca” foi identificada como “F”.

Uma segunda amostra foi adquirida como raiz de maca fresca no mercado municipal (San Camilo) da cidade de Arequipa, no Peru. A amostra foi lavada com hipoclorito de sódio, seca ao sol e moída até pó sendo identificada como “R”.

### 4.2. DESLIPIDIFICAÇÃO

A amostra seca foi submetida a deslipidificação com tolueno-etanol em proporção de 2:1 (v.v<sup>-1</sup>) em aparelho Soxhlet, por 20 horas. Após a deslipidificação o resíduo foi seco para ser submetido à inativação enzimática.

### 4.3. INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA

Para a inativação enzimática a amostra foi tratada com metanol-água 4:1 (v.v<sup>-1</sup>) por 20 minutos sob fervura em refluxo e o material foi seco e submetido a hidrólise enzimática do amido.

### 4.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO

Para remoção do amido a “farinha de maca” foi tratada com a enzima alfa amilase TDF-100A A3306 Sigma Aldrich, a 50±5 °C. A degradação do amido foi monitorada pelo teste do lugol. O material foi centrifugado e o resíduo lavado com a água e etanol e seco, resultando na farinha de maca livre de amido. O sobrenadante foi submetido a fervura durante 30 minutos, e a enzima desnaturada foi removida por

centrifugação. Após a remoção da enzima o material foi dialisado, concentrado e precipitado com etanol.

#### 4.5. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A farinha de maca deslipidificada, inativada e livre de amido foi submetida a extrações seqüenciais com água a 93°C e com soluções de NaOH nas concentrações 1M, 2M e 4M.

Os polissacarídeos dos extratos provenientes das extrações com água foram obtidos por precipitação com etanol (3 vol). Após a precipitação, os polissacarídeos foram tratados com etanol absoluto (3 vezes) e secos em estufa a vácuo.

As extrações alcalinas foram realizadas na presença de boroidreto de sódio. Os extratos alcalinos foram acidificados com ácido acético 50% até pH de 5 e os polissacarídeos que precipitaram nestas condições foram separados por centrifugação e secos em estufa a vácuo, sendo denominados hemicelulose A. O sobrenadante obtido após a precipitação da hemicelulose A foi dialisado, concentrado e então precipitado com etanol 3:1 v.v<sup>-1</sup>, originando a fração hemicelulose B, que foi separada por centrifugação e seca em estufa a vácuo.

#### 4.6. FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS

Para o fracionamento dos polissacarídeos foram utilizadas técnicas de precipitação seletiva e métodos cromatográficos.

##### 4.6.1. Congelamento e degelo

O polissacarídeo solubilizado em água destilada até a saturação foi submetido ao processo de congelamento e posterior degelo em temperatura ambiente, o precipitado insolúvel em água fria foi separado por centrifugação (9000 rpm por 15 minutos a 25°C). O processo foi repetido até que o sobrenadante aquoso não apresentasse mais precipitado (GORIN; IACOMINI, 1984).



#### 4.6.2. Precipitação dos polissacarídeos com base quaternária de amônio (Cetavlon)

Os polissacarídeos ( $0,25 \text{ \% m.v}^{-1}$ ) foram solubilizados em tampão fosfato pH 7.6 e então foi adicionada gota a gota uma solução de cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio) até a formação de um precipitado (SCOTT, 1965). O material permaneceu sob refrigeração durante 16h e então foi centrifugado. O sobrenadante da centrifugação foi dialisado e liofilizado e o precipitado foi tratado com NaCl 0,15 M para dissociar o complexo polissacarídeo ácido-cetavlon; o material solubilizado foi separado da porção insolúvel por centrifugação e então dialisado e liofilizado. O precipitado remanescente foi descomplexado com solução de NaCl 0,5 M.

#### 4.6.3. Métodos cromatográficos

##### 4.6.3.1. Cromatografia de troca iônica

Os polissacarídeos dissolvidos em água foram purificados por cromatografia de troca iônica utilizando uma coluna de 20 cm x 3,8 cm (d.i) contendo DEAE-Trisacryl Plus M (forma  $\text{Cl}^-$ ). As frações foram eluídas com água destilada e concentrações crescentes de cloreto de sódio (0,15M e 1,0M). A coleta das frações foi feita com coletor de frações 7000 Ultrarac da LKB Bromma. As frações que deram positivo ao teste do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), foram dializadas (quando necessário), concentradas e liofilizadas.

##### 4.6.3.2. Cromatografia de Gel Permeação

Os polissacarídeos dissolvidos em água foram fracionados em coluna de Sepharose CL-2B (Sigma Aldrich), 26,3 cm x 1,7 mm (d.i). Utilizou-se água como eluente a um fluxo de  $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$ .

#### 4.7. MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

Todas as análises foram feitas em triplicata, e as leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro SP-22 Biospectro®.

O conteúdo de açúcar total foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), a leitura foi feita em comprimento de onda de 490 nm. O padrão empregado foi a glucose nas concentrações de 20-100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A dosagem de ácidos urônicos foi realizada através do método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), tendo como solução padrão ácido galacturônico nas concentrações de 20-100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e as leituras de absorbância em 525 nm.

Os teores de proteínas foram determinados pelo método de Peterson (1977) sendo as leituras de absorbância efetuadas a 750 nm. O padrão empregado foi a soroalbumina bovina (BSA-Sigma) nas concentrações de 20-100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### 4.8. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

Os polissacarídeos foram hidrolisados com ácido trifluoracético (TFA) 2M por 5 horas a 100°C. Ao término da hidrólise o excesso de ácido foi removido por evaporação (ADAMS, 1965; BIERMANN; MCGINNIS, 1989). Para a hidrólise do resíduo final das extrações, utilizou-se o método de Saeman, *et al.* (1954), com uma pré-hidrólise com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72 % (p.p<sup>-1</sup>), durante 1 hora, em banho de gelo, seguido de diluição para 8%, a 100 °C por 5 horas. O excesso de ácido foi neutralizado com  $\text{Ba}_2\text{CO}_3$  e sal resultante removido por filtração. Os monossacarídeos resultantes da hidrólise foram reduzidos com boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), em meio aquoso, a 25°C (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). Em seguida foi adicionado ao material resina catiônica Lewatit S-100 para a remoção do cátion sódio ( $\text{Na}^+$ ) e para decompor o excesso do agente redutor. O material foi filtrado, evaporado até a secura e lavado sucessivamente com metanol (1 mL por três vezes) para a remoção do ácido bórico remanescente por co-distilação com metanol, na forma de borato de trimetila. Após completa secura, os alditóis foram acetilados com anidrido acético – piridina (1:1 v.v<sup>-1</sup>) durante 16 horas a temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Esta reação foi interrompida com a

adição de gelo moído e os alditóis acetatos foram extraídos com clorofórmio. O excesso da piridina na fase clorofórmica foi eliminada com sucessivas lavagens com sulfato de cobre 5% e água de forma alternada. A fase clorofórmica foi lavada várias vezes com água destilada, e evaporada depois a 25°C para posterior análise por cromatografia líquido-gasosa.

As análises de cromatografia líquido-gasosa (GLC) foram realizadas num cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890 A II, equipado com detector de ionização de chama, utilizando nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de 2 mL.min<sup>-1</sup>. Uma coluna capilar [30 m x 0,25 mm (d.i.)] DB-225 foi usada, com espessura de filme 0,25 µm, sendo a temperatura do detector 300°C e do injetor 250°C (SLONEKER, 1972).

#### 4.9. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA ACOPLADA A DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ LASER MULTIÂNGULOS E DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (HPSEC-MALLS/RI/UV)

As amostras (1 mg.mL<sup>-1</sup>) foram solubilizadas em solução de NaNO<sub>2</sub> 0,1 M contendo 200ppm de NaN<sub>3</sub>. As amostras foram filtradas utilizando membranas de acetato de celulose de 0,2µm.

As análises foram efetuadas em um cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 (RI) e detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS em série, com limites de exclusão de 7.10<sup>6</sup>, 4.10<sup>5</sup>, 8.10<sup>4</sup> e 5.10<sup>3</sup> g.Mol<sup>-1</sup>.

O eluente utilizado foi uma solução de NaNO<sub>2</sub> 0,1 M contendo NaN<sub>3</sub> 200 ppm, com fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, monitorado através de bomba peristáltica WATERS 515.

#### 4.10. ANÁLISE DE METILAÇÃO

A amostra seca foi metilada duas vezes pelo método de Ciucanu e Kerek (1984), no qual 4 mg do polissacarídeo foi solubilizado em 0,3 mL de DMSO (Me<sub>2</sub>SO), seguido da adição de 20 mg de NaOH seco e pulverizado. Adicionando-se em seguida 0,1 mL

de iodeto de metila ( $\text{CH}_3\text{I}$ ), O sistema permaneceu sob agitação por 6 min em aparelho Vortex. A reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de água. O polissacarídeo metilado foi extraído com 1,0 mL de clorofórmio e lavado três vezes com 10 mL de água destilada e vaporada em atmosfera de nitrogênio.

Os polissacarídeos metilados foram submetidos a hidrólise com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 72% com uma pré-hidrólise de uma hora, seguido de diluição para 8% e uma hidrólise de 5 horas a  $100^\circ\text{C}$ . O ácido foi neutralizado com  $\text{Ba}_2\text{CO}_3$  e sal resultante removido por filtração. Os monossacarídeos resultantes da hidrólise foram reduzidos e acetilados como descrito no item 4.8 e analisados por cromatografia líquida gasosa acoplada a espectrometria de massa (GLC-MS). As análises por GLC-MS foram realizadas em cromatógrafo gasoso, modelo VARIAN 3300 acoplado a um espectrômetro de massa FINNIGAN-MAT, com injetor a  $50^\circ\text{C}$  e “rampa” de  $40^\circ\text{C}$  por minuto até  $220^\circ\text{C}$ , equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) revestidas com DB-225 e hélio como gás de arraste ( $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ).

#### 4.11. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ( $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ )

Os espectros de  $\text{RMN-}^{13}\text{C}$  foram obtidos em um aparelho BRUKER, modelo AVANCE DRX-400, com ressonância de  $^{13}\text{C}$ , de 100MHz, utilizando a temperatura de  $70^\circ\text{C}$ . As amostras foram solubilizadas em  $\text{D}_2\text{O}$  e acetona foi utilizada como padrão interno ( $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$  30.2).

#### 4.12. TESTES DE ATIVIDADE INSETICIDA

##### 4.12.1. Obtenção dos extratos

Foi preparado um extrato etanólico e um aquoso a partir da “farinha de maca” utilizando 200 gramas de amostra para 750 mL do solvente (em uma proporção de  $1:3,75 \text{ m} \cdot \text{v}^{-1}$ ). A extração foi feita a temperatura ambiente por 24 horas sob agitação mecânica. Após este período, o extrato foi separado por centrifugação a 10000 rpm,

5°C por 30 minutos, concentrado em rotaevaporador a 45°C (ZHANG *et al.*, 2006) até uma densidade de 1.0958 g.mL<sup>-1</sup>. O processo foi repetido por três vezes.

Os extratos foram utilizados nas concentrações de 0,12; 0,25; 0,60; 0,85 e 1,00%.

#### 4.12.2. Insetos, ovos e larvas

Para realização dos bioensaios foram utilizados exemplares das colônias *Aedes aegypti* colônias Rockefeller, mantidas no insetário do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária do Departamento de Zoologia da UFPR. A primeira colônia iniciada em fevereiro de 2000 com exemplares de *Aedes aegypti* Rockefeller CDC de Porto Rico cedida pelo Professor Dr. Carlos Fernando Andrade da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A segunda foi iniciada em março de 2003 a partir de exemplares imaturos de *Aedes aegypti* cedidos pelo laboratório de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) sob coordenação do Professor Dr. José Lopes (LUNA, 2004; PROPHIRO, 2008).

#### 4.12.3. Condições de manutenção da colônia *Aedes aegypti* Rockefeller, no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da UFPR.

As colônias foram mantidas individualizadas em gaiolas cúbicas de madeira medindo 50cm x 50cm, com lados revestidos com tecido com malha de menos de 0,1 mm com exceção do fundo “Eucatex” e provida mesma na parede lateral com manga de tecido de algodão. Estas gaiolas permaneceram sujeitas às variações da luz natural, sem interferência, sob temperatura de 25°C ( $\pm 2,0^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa do ar de 80% ( $\pm 10\%$ ).

A manutenção das colônias era realizada a cada dois ou três dias fornecendo solução açucarada a 10 % em frasco com papel filtro. Para alimentação sangüínea de *Aedes aegypti* era introduzido na gaiola um rato “*Mus musculus*” fornecido pelo biotério do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Depois dos repastos, para obtenção dos ovos, as fêmeas foram introduzidas na gaiola contendo frascos de vidro de 120 mL de água munidos com tiras de papel filtro

circundando a borda. Após a oviposição as tiras de papel filtro mantidas em caixas plásticas com umidade 80%, temperatura 25°C oferecendo assim condições propícias para a embriogênese e formação de larvas.

As larvas, eclodidas foram mantidas externamente em bandejas colocadas em estantes e alimentadas com ração para peixe TetraMin®. Colocava-se nas bandejas aproximadamente 2 a 3 g da ração macerada e diluída em água. A cada três dias era trocada a água e se adicionava a mesma quantidade de alimento.

#### 4.12.4. Avaliação da ação larvívica do extrato contra *Aedes aegypti* e análise dos resultados dos bioensaios

Os testes foram feitos com um volume final de 200 mL, contendo 20 larvas nas concentrações de 0,12; 0,25; 0,60; 0,85 e 1,00% (p.v<sup>-1</sup>) do extrato. A leitura da mortalidade e sobrevivência foi realizada 24 horas após a adição do produto utilizando os procedimentos elaborados por Dulmage *et al.* (1990). Os dados de CL50 e CL95 foram estimados através da análise de Probit (FINNEY, 1981), utilizando o programa PROBIT. Os cálculos estatísticos utilizaram análises de variância (ANOVA) tendo como variável dependente a mortalidade pelo produto biológico. Os resultados do teste de Homogeneidade de variâncias (Teste de Levene) foram avaliados a um nível de significância de 5% ( $\alpha = 0.05$ ), as análises foram realizadas através do programa "Statistical Package for the Social Sciences" (SPSS) versão 10.0.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE MACA (*Lepidium meyenii*) A PARTIR DE UMA AMOSTRA COMERCIAL DE “FARINHA DE MACA”

A “farinha de maca” (317g de “farinha comercial de Maca Santa Natura”) foi inicialmente submetida à deslipidificação com tolueno-etanol (2:1, v.v<sup>-1</sup>). Este tratamento promoveu uma redução de 26,2% da massa em relação ao material inicial. Este valor é extremamente elevado quando comparado ao teor de lipídios descrito na literatura para as raízes secas de maca (~2%), indicando que o sistema utilizado foi capaz de solubilizar outros compostos presentes na “farinha de maca”.

Após a deslipidificação, o material foi submetido a uma inativação enzimática com metanol-água (4:1, v.v<sup>-1</sup>). Normalmente este tratamento também é efetivo na remoção de carboidratos de baixa massa, entretanto neste caso, observou-se que o extrato estava viscoso indicando a presença de compostos de massa molar mais elevada. O extrato foi tratado com etanol (3v), promovendo a precipitação de uma fração que foi denominada MFMe.

De acordo com Paulet, Carrasco e Sánchez (2006) as raízes secas de maca contêm 20% de amido. Uma vez que o amido de maca já foi caracterizado (Rondan-Sanabria e Finardi-Filho, 2008), a “farinha de maca” deslipidificada e inativada foi submetida à hidrólise com  $\alpha$ -amilase a fim de remover o amido e assim facilitar a obtenção e estudo dos outros polissacarídeos presentes no material. Após a digestão enzimática, o material foi centrifugado e o resíduo lavado com água e etanol e posteriormente seco, resultando na farinha de maca livre de amido, a qual foi utilizada para as extrações dos polissacarídeos da parede celular. O sobrenadante foi submetido a fervura durante 30 minutos, e a enzima desnaturada foi removida por centrifugação. Após a remoção da enzima, o sobrenadante foi dialisado, concentrado e precipitado com etanol resultando na fração MFW.

A “farinha de maca” deslipidificada, inativada e livre de amido foi submetida extrações seqüenciais, com água a 93°C e com soluções de NaOH em concentrações

de 1M, 2M e 4M a 25°C. Na figura 5 pode-se visualizar o esquema de extrações utilizado e as frações polissacarídicas resultantes de cada extração.

Nas extrações alcalinas após a separação do extrato, este foi acidificado com ácido acético 50%, e os polissacarídeos que precipitaram nestas condições foram denominados hemicelulose A. O sobrenadante resultante foi dialisado, concentrado e então precipitado com 3 volumes de etanol, originando a fração hemicelulose B. Para a extração com NaOH 1M, durante a diálise observou-se a formação de um precipitado que foi denominado de hemicelulose D (diálise).

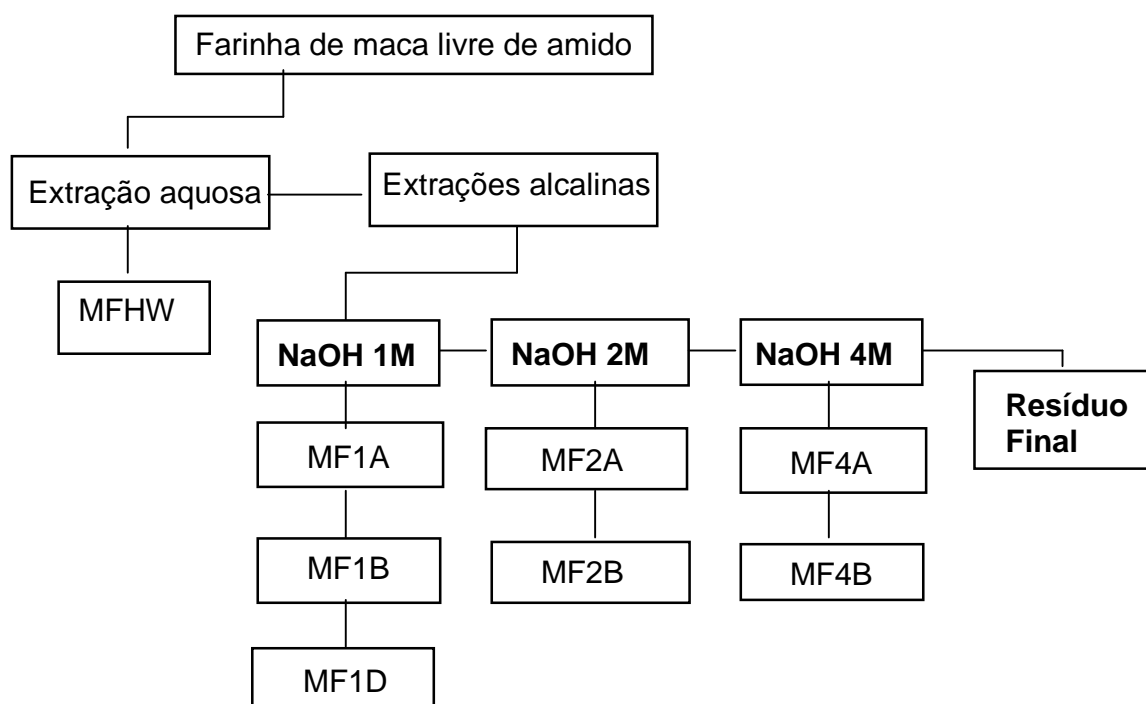
Para a identificação das frações utilizou-se o seguinte critério: todas as frações receberam inicialmente a letra “M” em referência à maca, seguida da letra “F” que identifica a amostra inicial como a “f<sub>arinha</sub> de maca” comercial. Após as letras MF, a identificação faz referência ao meio de extração utilizado: “HW” (hot water) para a extração com água a quente e para as extrações alcalinas um número que correspondente à concentração molar da solução utilizada seguida da letra “A”, “B” ou “D”, conforme o tipo de hemicelulose A, B ou D.

O resíduo final, obtido após as extrações, foi lavado com água até a neutralidade para posterior hidrólise.

Na tabela 3 está indicado o rendimento e os conteúdos de açúcar total e proteína das frações polissacarídicas obtidas. Todas as frações apresentaram baixos rendimentos, sendo as frações MFMe, MFW e MFHW as de maior rendimento. Nas frações alcalinas, a fração MF4B, obtida com NaOH 4M, foi a de maior rendimento (1,9%), seguida da fração MF2B (1,3%), obtida com NaOH 2M.

Nas frações alcalinas, o rendimento das hemiceluloses B foi superior ao das hemiceluloses A, sugerindo o predomínio de polissacarídeos de massa molar elevada.





**FIGURA 5.** DIAGRAMA DE EXTRAÇÕES UTILIZADO PARA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA “FARINHA DE MACA”.

Em geral, os teores de açúcar total também foram baixos, entretanto estes valores podem estar subestimados devido à utilização de um padrão que não represente a composição da amostra, uma vez que se sabe que o método é sensível ao tipo de açúcar utilizado. Além disso, este método também pode fornecer valores inferiores aos reais quando a amostra contém quantidades elevadas de ácidos urônicos. A fração MF2B foi a que apresentou o maior conteúdo de açúcar total, 81%.

**TABELA 3.** RENDIMENTO, CONTEÚDO DE AÇÚCAR TOTAL E PROTEÍNAS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DA “FARINHA DE MACA”.

Frações	Rendimento <sup>a</sup> % (m/m)	Açúcar Total <sup>b</sup> (%)	Proteínas <sup>c</sup> (%)
MFMe	2,2	52,2	10,6
MFW	2,5	52,1	18,2
MFHW	2,0	43,0	2,3
MF1A	1,0	29,9	59,1
MF1B	1,1	39,8	33,4
MF1D	0,2	11,6	8,4
MF2A	0,8	9,2	26,7
MF2B	1,3	81,0	14,8
MF4A	0,5	4,3	17,3
MF4B	1,9	34,3	34,2

<sup>a</sup> Em relação a farinha de maca deslipidificada.

<sup>b</sup> Determinado pelo método de Dubois et al. (1956).

<sup>c</sup> Determinado pelo método de Peterson (1977).

Os teores de proteína variaram de 2 % a 59%, sendo a fração MFHW, obtida com água a quente, a que apresentou menor conteúdo protéico. Esta fração apresentou 43% de açúcar total e está entre as frações de maior rendimento.

Na tabela 4 observamos a composição monossacarídica das frações obtidas a partir da “farinha de maca”.

A fração obtida durante o tratamento com metanol-água (MFMe), e as frações solubilizadas com água (MFW e MFHW) apresentaram altas proporções de Glc, Ara e ácidos urônicos, além de menores proporções de Gal, Man, Xyl e traços de ramnose e fucose. A fração MFHW, obtida por extração aquosa a 93°C, apresentou o maior conteúdo de ácidos urônicos (36%). Os altos percentuais de glucose encontrados nas frações MFMe, MFW e MFHW podem ser indicadores da presença de glucanas, conforme já observado para raízes de outras espécies. Em geral, as glucanas isoladas de raízes foram obtidas a partir de extrações aquosas (CAO *et al.*, 2006; CUI *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2000; SHI; FU; CHEN, 2007). Entretanto, polissacarídeos mais complexos já foram obtidos por extração aquosa a quente das raízes de outras espécies (ASSINEWE *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2007). Das raízes de *Bupleurum smithii* foi isolado um polissacarídeo que continha Ara, Gal, Rha, Glc, Xyl, Man e GalA (XU *et al.*,

2007). Assinewe *et al.* (2002) extraíram das raízes de *Panax quinquefolius* um polissacarídeo formado por Glc, Ara, Rha e Man.

**TABELA 4. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA “FARINHA DE MACA”**

AMOSTRA	MONOSSACARÍDEOS <sup>a</sup>							
	(%)							
	RAMNOSE	FUCOSE	ARABINOSE	XILOSE	MANOSE	GALACTOSE	GLUCOSE	A. URÔNICOS <sup>b</sup>
MFMe	0,6	0,1	22,8	0,8	2,1	14,4	39,8	19,5
MFw	0,0	0,0	8,0	7,4	1,7	1,3	54,6	27,0
MFHW	0,4	0,6	14,2	6,7	2,5	6,8	32,9	36,0
MF1A	0,5	0,5	7,4	38,9	1,7	3,0	36,0	12,0
MF1B	0,6	2,8	36,6	19,0	1,7	16,1	20,9	2,4
MF1D	1,9	1,0	43,5	7,9	14,3	5,8	21,8	3,8
MF2A	0,6	1,2	10,0	62,1	2,1	3,7	15,5	4,9
MF2B	0,3	6,1	8,9	29,3	6,1	15,5	21,7	12,1
MF4A	1,0	0,7	8,7	62,9	3,2	3,2	15,2	5,2
MF4B	1,6	2,7	15,2	14,6	24,8	21,8	15,5	3,8

<sup>a</sup> Determinado por GLC.

<sup>b</sup> Determinado por método colorimétrico.

De uma forma geral, as hemiceluloses diferenciaram-se pela predominância de Xyl nas frações de hemiceluloses A, enquanto que a Ara foi o monossacarídeo predominante na fração de hemiceluloses B obtida com NaOH 1M. Já as fração MF4B destaca-se pelo elevado conteúdo de manose (24,8%) e galactose (21,8%).

As frações de hemicelulose A obtidas com NaOH 2M e 4M apresentaram praticamente a mesma composição, com predomínio de Xyl (~62%), seguido de Glc (~15%), Ara (~10%), ácidos urônicos (~ 5%) e 2% dos desoxiaçúcares. Estes resultados sugerem que estas frações provavelmente contêm uma mistura de polissacarídeos, com predomínio de xilanas ácidas.

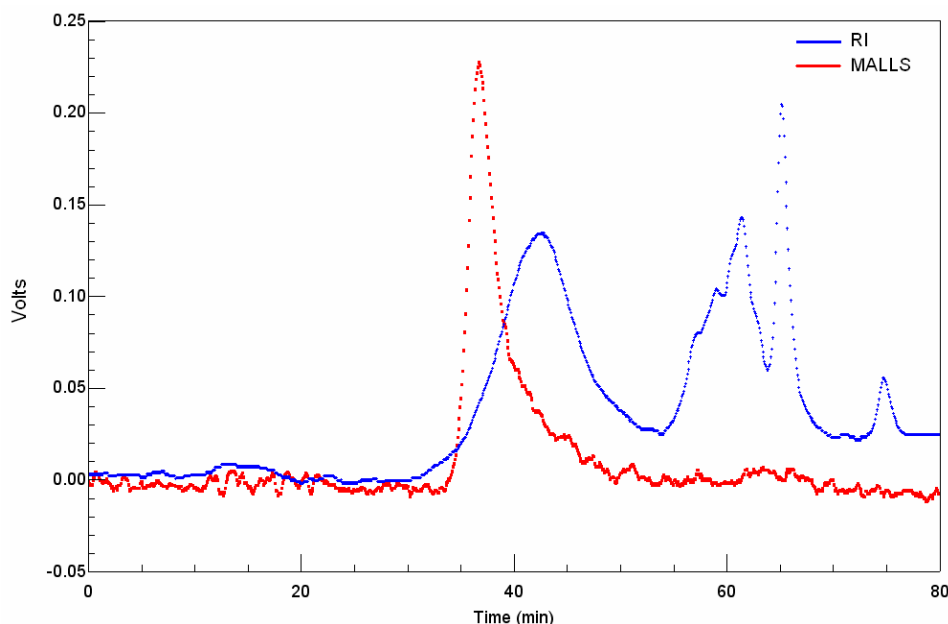
As frações de hemicelulose B apresentaram altos percentuais de Ara, Gal, Xyl e Glc sugerindo a possibilidade da presença de xiloglucanas, arabinanas, galactanas e arabinogalactanas.

O polissacarídeo que precipitou durante a diálise (MF1D) apresentou predominância de Ara e conteúdos mais elevados de Man do que a respectiva hemiceluloses B.

Todas as frações foram analisadas por HPSEC-MALLS/RI, e apresentaram perfis de eluição com dois ou mais picos, indicando serem heterogêneas. Estes dados serão apresentados posteriormente para as frações selecionadas para purificação.

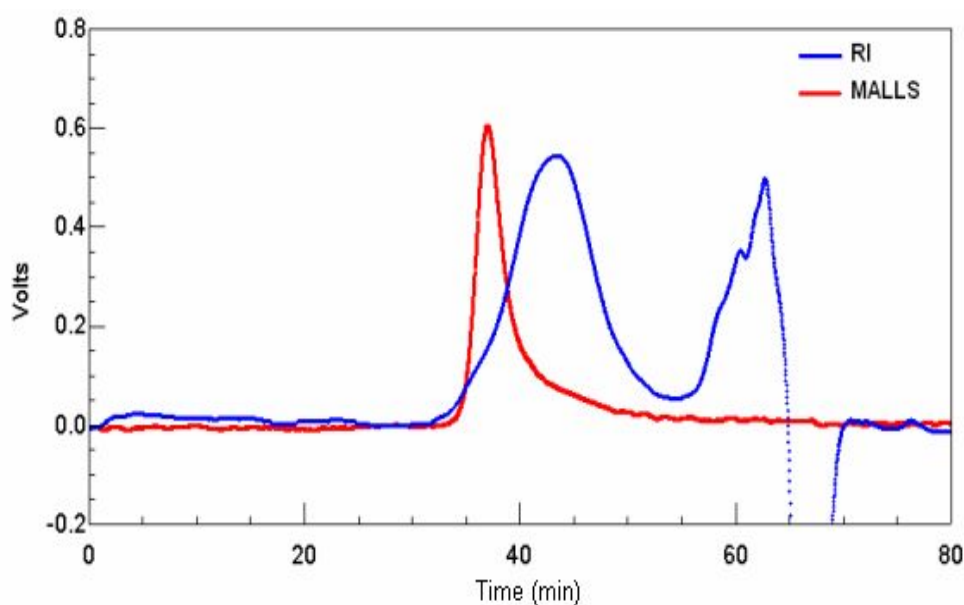
O resíduo final obtido após as extrações aquosas e alcalinas foi composto por 58,1% de Glc, além de Rha (1,7%), Fuc (1,7%), Ara (14,7%), Xyl (16,0%), Man (3,2%) e Gal (4,7%). Estes resultados sugerem a predominância de celulose no resíduo final insolúvel, além de pequenas quantidades de outros polissacarídeos.

A fração aquosa, MFW, foi a de maior rendimento (2,5%) e se destaca pelas altas quantidades de glucose e ácidos urônico, sugerindo a presença de glucanas. O perfil de eluição da fração MFW por HPSEC-MALLS/RI está mostrado na figura 6, onde pode se observar a presença de um pico principal detectado pelo RI, eluindo em ~45 min. Este pico tem a base bastante alargada e não é coincidente com o sinal do MALLS. Vários picos de menor intensidade foram detectados apenas pelo RI, em tempos de eluição maior indicando tratar-se de moléculas de menor massa, as quais estão presentes em menor quantidade.



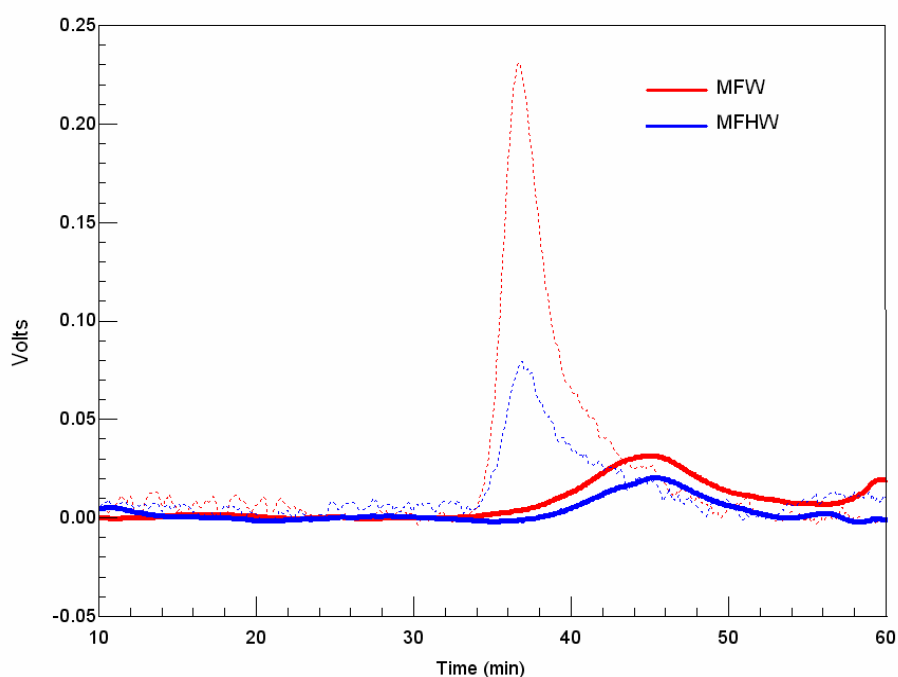
**FIGURA 6.** PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DA FRAÇÃO MFW.

Para tentar eliminar os contaminantes de baixa massa molar presentes na fração MFW o material foi submetido à diálise. Após a diálise não houve alteração no perfil de eluição da amostra por HPSEC-MALLS/RI. Na tentativa de purificar a fração MFW o material foi cromatografado em coluna de permeação em gel contendo Sepharose CL-2B. Entretanto, o processo não foi eficiente para o fracionamento da amostra. Também foi feita uma tentativa de utilizar o processo de fracionamento por congelamento e degelo. Neste processo observou-se a formação de uma quantidade desprezível de precipitado, que não pode ser analisado. O sobrenadante do procedimento de congelamento e degelo, denominado MFWD, apresentou o mesmo perfil de eluição (figura 7) da fração original, MFW.



**FIGURA 7.** PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DA FRAÇÃO MFWD.

Conforme pode ser observado na tabela 4, a fração MFHW (rendimento 2%) apresentou uma composição monossacarídica semelhante a fração MFW e os perfis de eluição desta amostras também foram bastante semelhantes (Figura 8).



**FIGURA 8.** PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DAS FRAÇÕES MFV E MFHW.

Considerando a composição da fração MFHW e os dados da literatura que relatam a presença de glucanas neutras obtidas por extrações aquosas a quente de raízes de diferentes espécies (CAO *et al.*, 2006; CUI *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2000; SHI; FU; CHEN, 2007), a amostra foi fracionada por precipitação com cetavlon. A fração neutra, que não precipitou com cetavlon, foi denominada MFHWA e as frações que precipitaram com cetavlon e foram descomplexadas pela adição de NaCl 0,15 e 0,5 M, foram denominadas MFHW15 e MFHW50, respectivamente. A composição da fração MFHW e das frações originadas do tratamento com cetavlon está indicada na tabela 5.

Conforme pode ser observado na tabela 5, a fração neutra obtida a partir do fracionamento com cetavlon apresentou um aumento de 69% no conteúdo de glucose em relação à fração original, entretanto ainda apresenta vários outros monossacarídeos, destacando-se a arabinose (25,6%) e a galactose (10,3%). As frações ácidas, MFHW15 e MFHW50, apresentaram predominância de arabinose e galactose, sugerindo conter frações pécicas.

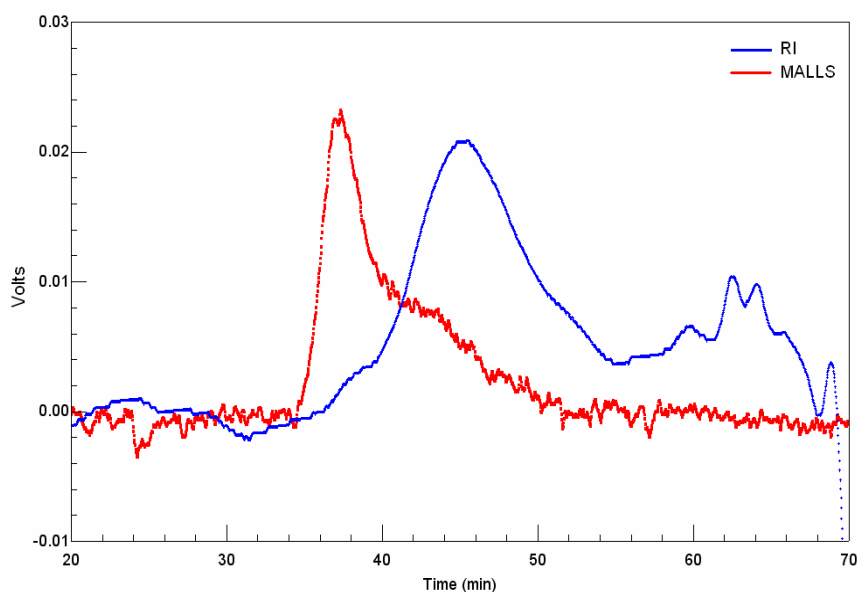
**TABELA 5.** COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO MFHW E DAS FRAÇÕES RESULTANTES APÓS O FRACIONAMENTO COM CETAVLON.

AMOSTRA	MONOSSACARÍDEOS <sup>a</sup>							
	(%)							
	RAMNOSE	FUCOSE	ARABINOSE	XILOSE	MANOSE	GALACTOSE	GLUCOSE	A. URÔNICOS <sup>b</sup>
MFHW	0,4	0,6	14,2	6,7	2,5	6,8	32,9	36,0
MFHWA	0,5	0,0	25,6	5,6	2,4	10,3	55,6	0,0
MFHW15	2,1	0,3	59,2	1,9	0,8	15,6	3,7	16,3
MFHW50	6,7	0,0	54,8	3,2	2,5	15,3	7,9	9,5

<sup>a</sup> Determinado por GLC.

<sup>b</sup> Determinado por método colorimétrico.

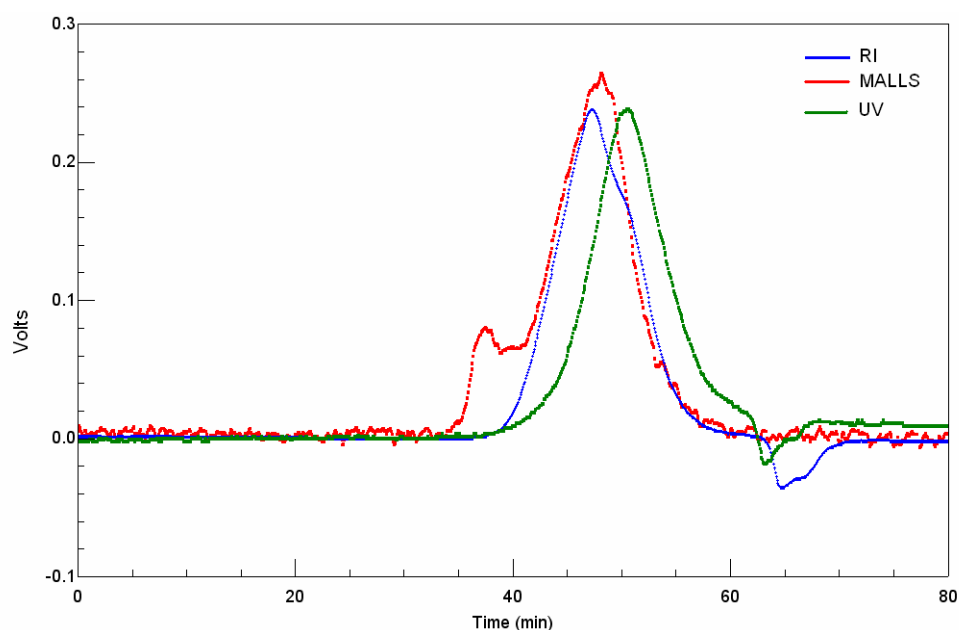
As três frações provenientes do tratamento com cetavlon apresentaram perfil heterogêneo nas análises de HPSEC-MALLS/RI, conforme demonstrado para a fração MFHW50 (figura 9).



**FIGURA 9.** PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DA FRAÇÃO MFHW50.

A fração MF2B apresentou o segundo maior rendimento entre as extrações alcalinas e foi aquela que apresentou o maior conteúdo de açúcar total (81%). A composição monossacarídica desta fração (tabela 4) sugere a presença de uma xiloglucana. As xiloglucanas estruturais normalmente são isoladas a partir das frações de hemicelulose B (BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001; FRY, 1989). O perfil

de eluição da amostra MF2B utilizando detectores de espalhamento de luz (MALLS), índice de refração (IR) e ultra-violeta (UV) está mostrado na figura 10.



**FIGURA 10.** PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI/UV DA FRAÇÃO MF2B.

É possível observar que a amostra MF2B não é homogênea. O detector de espalhamento de luz apresenta dois picos, um de menor intensidade eluindo antes dos 40 min e outro de alta intensidade eluindo após os 40 min, sendo apenas o segundo detectado pelo índice de refração. No perfil de eluição obtido pelo índice de refração observa-se um único pico, coincidente com o espalhamento de luz. Entretanto, o pico obtido pelo índice de refração não é simétrico, apresentando um pequeno “ombro”, o que sugere a presença de duas populações de polímeros. O detector de ultra-violeta ( $\lambda$  280 nm) apresenta um pico pronunciado, provavelmente devido a presença de proteína na amostra. Estes resultados estão de acordo com os dados de dosagem colorimétrica que indicaram que a amostra apresenta 14,8% de proteínas. Uma vez que a detecção pelo ultra-violeta não é coincidente nem com o índice de refração, nem com os sinais do espalhamento de luz, pode-se sugerir que a proteína não está covalentemente ligada aos polissacarídeos.



Baseado em protocolos anteriores utilizados no Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais da UFPR (BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001), empregou-se uma coluna de cromatografia de troca iônica contendo DEAE – Trisacryl Plus M na tentativa de isolar uma xiloglucana estrutural.

A tabela 6 compara a composição monossacarídica da fração MF2B com a fração eluída com água da coluna de troca iônica, que foi denominada MF2BW.

**TABELA 6.** COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO MF2B E DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS O FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.

AMOSTRA	MONOSSACARÍDEOS <sup>a</sup>							
	(%)							
	RAMNOSE	FUCOSE	ARABINOSE	XILOSE	MANOSE	GALACTOSE	GLUCOSE	A. URÔNICOS <sup>b</sup>
MF2B	0,3	6,1	8,9	29,3	6,1	15,5	21,7	12,1
MF2BW	Traços	9,3	3,1	47,1	8,9	15,0	16,4	0,0
MF2BS	0,7	4,4	33,6	27,8	4,3	19,6	9,6	nd

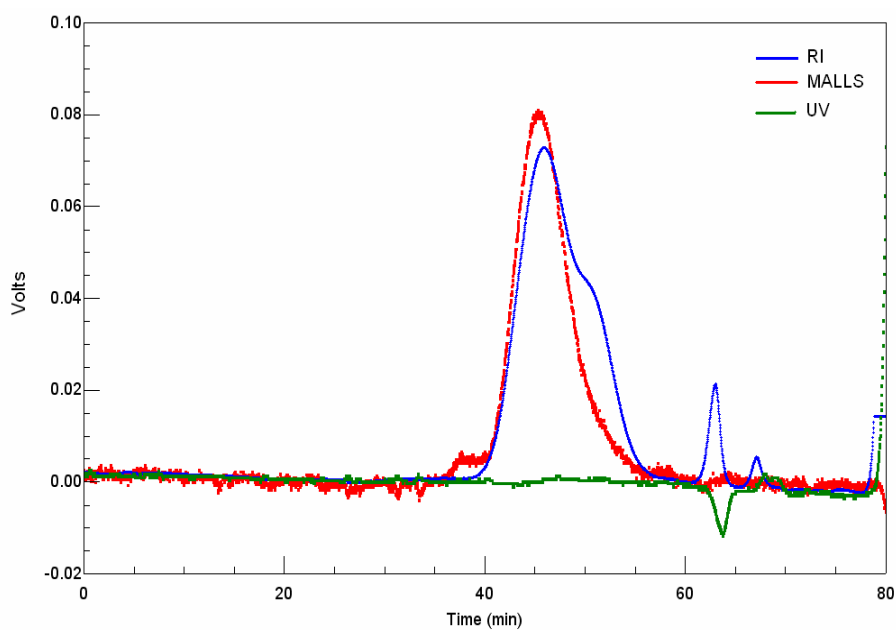
<sup>a</sup> Determinado por GLC.

<sup>b</sup> Determinado por método colorimétrico.

nd = não determinado

A composição monossacarídica da fração MF2BW indica que o componente ácido foi removido na cromatografia de troca iônica. Embora os monossacarídeos característicos de xiloglucanas estruturais estejam presentes na amostra, pequenas proporções de Ara e Man foram detectadas. Busato Vargas-Rechia, Reicher (2001) isolaram e caracterizaram uma xiloglucana estrutural das folhas de *Hymenaea courbaril* e também observaram a presença de pequenas proporções de Ara e Man. O conteúdo de Glc foi inferior ao esperado para uma xiloglucana, entretanto isto pode ser devido à dificuldade de hidrólise da cadeia celulósica da xiloglucana.

Na figura 11 pode-se observar o perfil de eluição da fração MF2BW, onde pode-se observar um pico proeminente detectado pelo RI e MALLS. A detecção do RI ainda mostra a presença de um pequeno “ombro”, entretanto verifica-se que o processo de troca iônica foi eficiente na remoção da proteína e também confirma que a proteína não estava ligada aos polissacarídeos.



**FIGURA 11.** PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI/UV DA FRAÇÃO MF2BW.

A fração MF2BW foi analisada por RMN- $^{13}\text{C}$  e o espectro obtido está mostrado na figura 12.

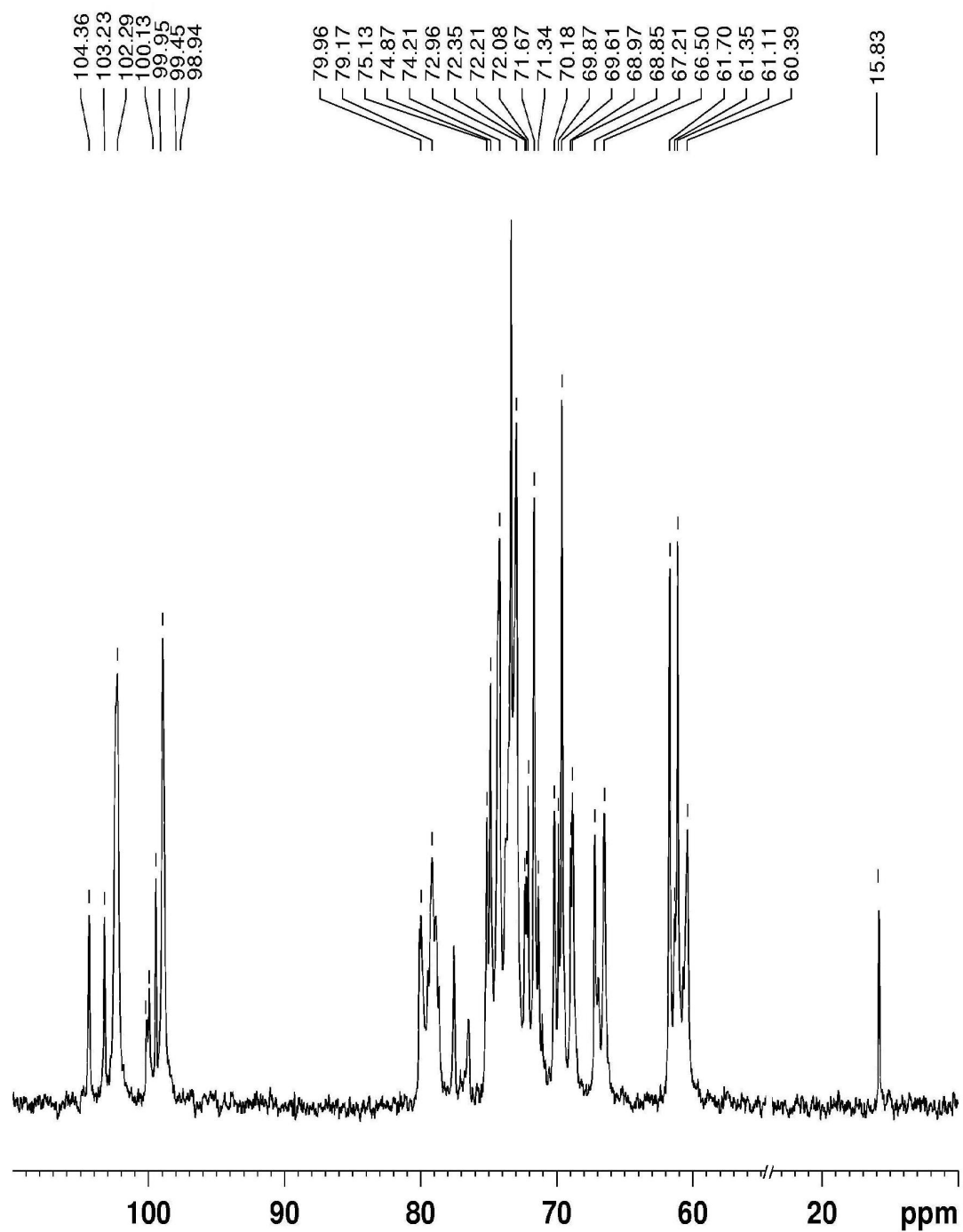
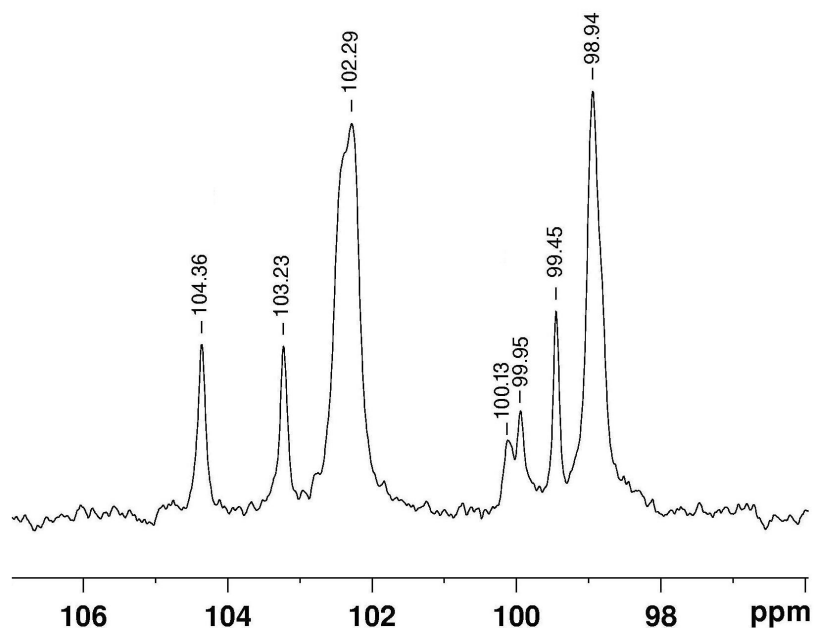


FIGURA 12. ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO MF2BW EM  $\text{D}_2\text{O}$  A  $70^\circ\text{C}$ .

Na figura 13 podem ser observados os sinais presentes na região anomérica da fração MF2BW.



**FIGURA 13.** REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA FRAÇÃO MF2BW.

As atribuições dos sinais da região anomérica de espectro de RMN-<sup>13</sup>C da xiloglucana presente na fração MF2BW está indicada na tabela 7. A região anomérica do espectro apresenta sinais característicos de uma xiloglucana estrutural, cuja estrutura parcial pode ser visualizada na figura 15 (BUCHALA *et al.*, 1993; BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001; CHAMBAT; BARNOUD; JOSELEAU, 1984). Um pequeno sinal em  $\delta$  100,13 ppm pode ser visualizado, entretanto este sinal normalmente não é encontrado nas xiloglucanas de estrutura clássica encontradas na parede celular de dicotiledôneas. É possível que a xiloglucana isolada da farinha de maca apresente uma estrutura não usual, entretanto considerando que a fração MF2BW não apresentou um perfil homogêneo por HPSEC, este sinal poderia ser

devido à presença de outro polissacarídeo. A fração MF2BW apresenta 8,9% de Man e o sinal em 100,13 ppm poderia ser devido a presença de um polissacarídeo contendo Man ligada  $\beta(1\rightarrow4)$ . Diversos autores (CUTILLAS-ITURRALDE *et al.*, 1998; GHOSH *et al.*, 2005; RAY *et al.*, 2004; REDGWELL *et al.*, 2003; VINCKEN; BELDMAN; VORAGEN, 1994) ao isolar xiloglucanas estruturais têm observado a presença de polissacarídeos contaminantes contendo Man  $\beta(1\rightarrow4)$ .

**TABELA 7.** DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ( $\delta$ ) DA REGIÃO ANOMÉRICA DA XILOGLUCANA PRESENTE NA FRAÇÃO MF2BW, OBTIDA DA “FARINHA DE MACA”.

UNIDADE MONOSSACARÍDICA	$\delta$ (PPM)
$\beta$ -Gal terminal	104,36
$\beta$ -Gal substituída	103,23
$\beta$ -Glc terminal	102,29
$\alpha$ -Fuc terminal	99,95
$\alpha$ -Xyl terminal	99,45
$\alpha$ -Xyl substituída	98,94

É possível distinguir outros sinais típicos de xiloglucanas (BUCHALA *et al.*, 1993; BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001; JOSELEAU; CHAMBAT, 1984). Os sinais em 60,4 e 61,1 ppm foram atribuídos ao C-6 das unidades de Gal terminal e substituídas, respectivamente. O sinal em 66,5 ppm foi atribuído ao C-6 das unidades de Glc e o sinal em 61,7 ppm ao C-5 das unidades de Xyl. Estas atribuições foram confirmadas pelo experimento de DEPT-135 que resulta na inversão dos sinais de  $\text{CH}_2$  (Figura 14).

O sinal em campo alto, em 15,8 ppm foi atribuído ao grupo metil das unidades de fucose.

Para identificar todos os sinais do espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da fração MF2BW seriam necessários experimentos de correlação  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , que não foram realizados devido a problemas na manutenção do equipamento, que permaneceu inoperante por quase meio ano.

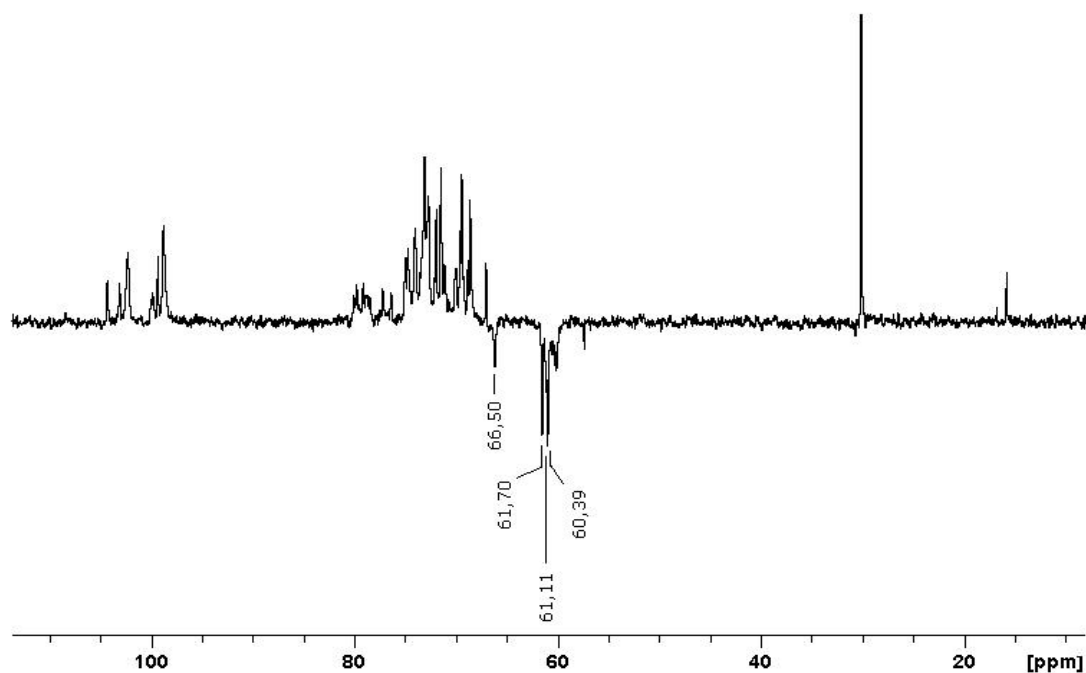


FIGURA 14. ESPECTRO DE DEPT-135 DA FRAÇÃO MF2BW EM D<sub>2</sub>O A 70°C.

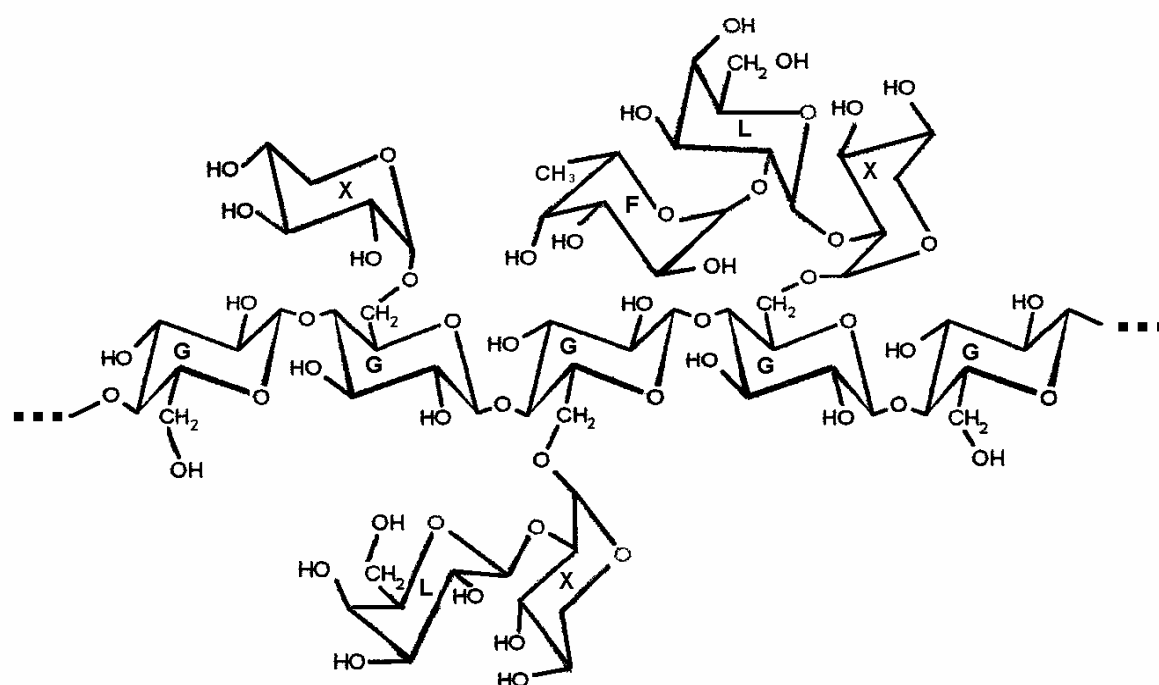


FIGURA 15. REPRESENTAÇÃO DE UM SEGMENTO DE UMA CADEIA DE XILOGLUCANA. GLUCOSE (G), XILOSE (X), GALACTOSE (L) E FUCOSE (F).  
**FONTE:** Petkowicz et al., 2006.

A análise de metilação da fração MF2BW confirmou que as unidades de Glc compõem a cadeia principal e estão unidas por ligações (1→4), pois o principal derivado encontrado foi o 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil glucitol seguido do 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil glucitol. A predominância do derivado di-metil da Glc indica que a maior parte das unidades de Glc está substituída no C6.

Em relação a análise dos derivados de Xyl, duas limitações foram encontradas: a primeira se refere a impossibilidade de distinguir os derivados 1,4,5-tri-O-acetil-2,3-di-O-metil xilitol e 1,2,5-tri-O-acetil-3,4-di-O-metil xilitol por seus padrões de fragmentação que são idênticos, devido a simetria da molécula. Um pico cujo perfil de fragmentação corresponderia a estes derivados foi encontrado na fração MF2BW metilada e de acordo com a estrutura clássica de xiloglucanas estruturais, o pico corresponderia ao derivado 1,2,5-tri-O-acetil-3,4-di-O-metil xilitol; e a segunda limitação diz respeito a coluna utilizada, DB 225, que não separa os derivados 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil xilitol e 1,5-di-O-acetil-6-deoxi-2,3,4-tri-O-metil galactitol. No cromatograma da fração MF2BW metilada foi identificado um pico em Rt 7,5, que pode ser proveniente da mistura dos derivados 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil xilitol e 1,5-di-O-acetil-6-deoxi-2,3,4-tri-O-metil galactitol. As dificuldades descritas na análise de metilação da xiloglucana poderiam ser superadas pela utilização de uma segunda coluna capaz de separar os derivados com mesmo tempo de retenção e para confirmar a identidade do derivado 1,2,5-tri-O-acetil-3,4-di-O-metil xilitol poderia se utilizar boroidreto de sódio deuterado na etapa de redução, entretanto estes experimentos não foram realizados devido à falta do equipamento de GLC-MS que permaneceu inoperante por mais de meio ano.

Dois derivados de galactose foram encontrados, o 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil galactitol e o 1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil galactitol, que corresponderiam a unidades de galactose terminal e substituídas na posição 2, as quais fariam parte das cadeias laterais da xiloglucana.

A presença de Man ligada (1→4) foi confirmada pela análise de metilação, onde foi identificado o derivado 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil manitol, provavelmente devido a presença de uma manana como contaminante. Cutillas-Iturralde et al. (1998) e

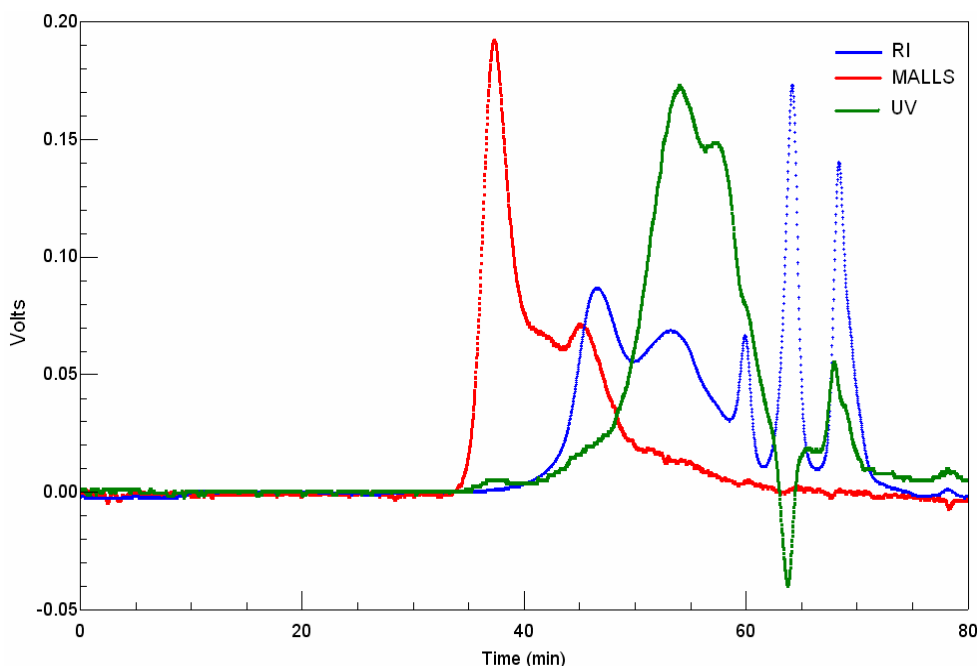
Busato (2004) também identificaram o derivado correspondente a Man ligada (1→4) nos produtos de metilação de xiloglucanas purificadas.

Embora vários autores já tenham isolado polissacarídeos de raízes (ASSINEWE *et al.*, 2002; CAO *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2000; HROMÁDKOVÁ *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2007; SHI; FU; CHEN, 2007; SONODA *et al.*, 1998; XU *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2006), neste trabalho foi isolada pela primeira vez uma xiloglucana estrutural (figura 15). Entretanto, experimentos adicionais ainda serão necessários para elucidar aspectos da estrutura fina do polímero.

Uma fração ácida foi recuperada do fracionamento por cromatografia de troca iônica contendo DEAE – Trisacryl Plus M. Esta fração foi eluída com NaCl 0,15M e foi denominada MF2BS e sua composição está indicada na tabela 6. A fração MF2BS apresentou altos percentuais de Ara, Xyl e Gal, além de menores proporções de Rha, Fuc, Man e Glc. O perfil de eluição da fração MF2BS está apresentado na figura 16, onde se pode verificar que a amostra contém uma mistura de polissacarídeos. Duas frações de baixa massa molar foram detectadas simultaneamente pelo índice de refração e ultra-violeta (280nm), sugerindo que o material está ligado a proteína. Considerando os altos conteúdos de Ara e Gal a fração poderia conter um arabinogalactana-proteína (AGP). A presença de AGP em raízes já foi descrita por Thude e Classen (2005) para *Echinacea pallida*. Além de Gal e Ara, a AGP isolada das raízes de *E. pallida* continha ácidos urônicos, e quantidades menores de Glc e Rha.

De acordo com a figura 16, a fração MF2BS também contém um polissacarídeo livre de proteína, eluindo após 45 min, que poderia tratar-se de uma xilana ácida, uma vez que a fração apresenta 27,8% de Xyl.

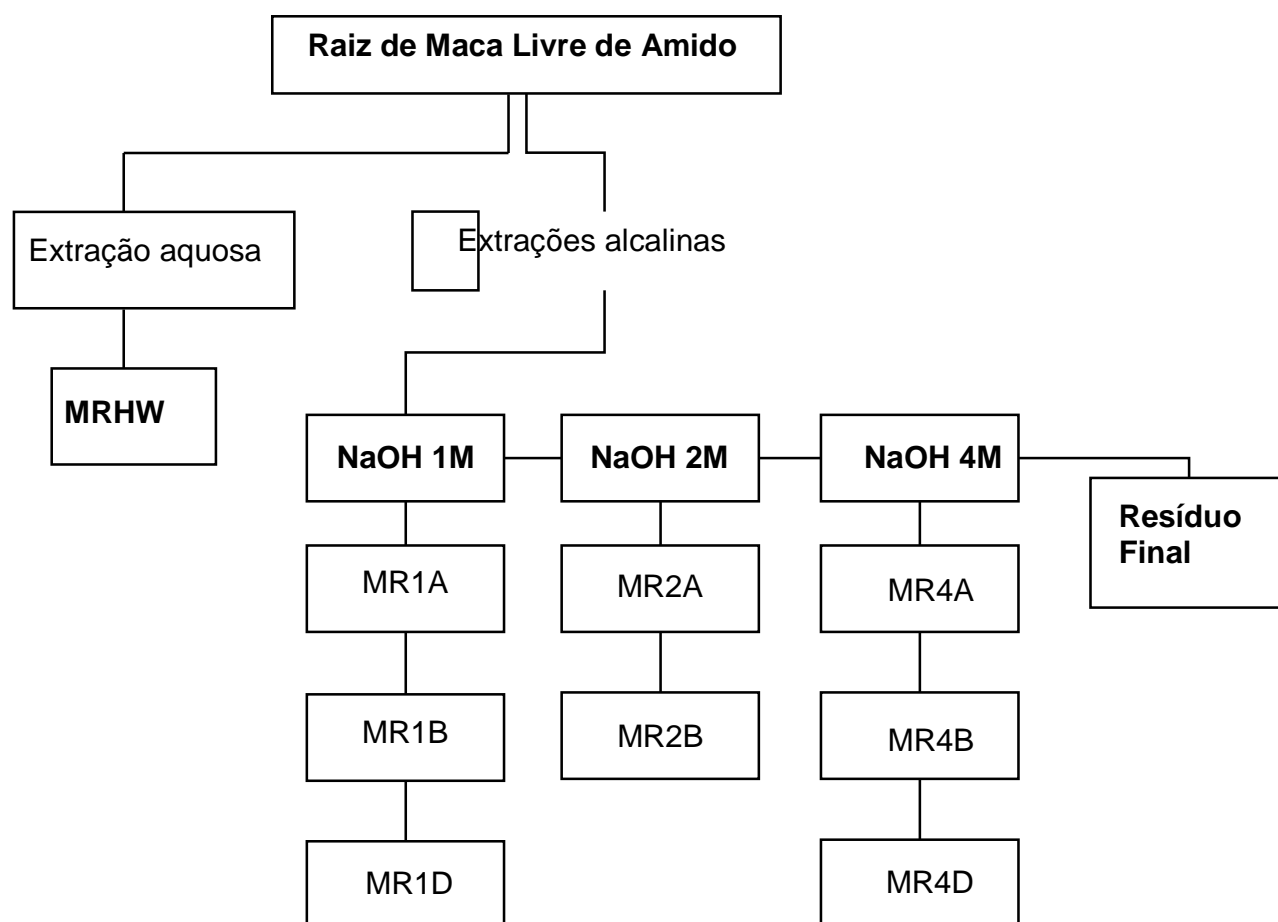




**FIGURA 16.** PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI/UV DA FRAÇÃO MF2BS.

## 5.2. EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS RAÍZES DE MACA E COMPARAÇÃO COM OS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA “FARINHA DE MACA”

Para investigar se existia diferença entre os polissacarídeos presentes nas raízes frescas de maca e o seu produto comercial, conhecido como “farinha de maca”, foram feitas extrações utilizando-se as raízes de maca. Raízes frescas de maca foram adquiridas no mercado municipal (San Camilo) da cidade de Arequipa no Peru. As raízes foram secas ao sol e moídas (50g), e então submetidas aos mesmos tratamentos que a amostra de “farinha de maca”. As raízes deslipidificadas, inativadas e livres de amido foram extraídas sequencialmente com água e álcali usando o mesmo protocolo de extração anteriormente utilizado para a “farinha de maca”. Para facilitar, o esquema de extrações utilizado e as frações polissacarídicas resultantes de cada extração estão indicados na figura 17. Para a identificação das frações utilizou-se o mesmo critério utilizado anteriormente apenas substituindo a letra “F” por “R” (raízes).



**FIGURA 17.** DIAGRAMA DE EXTRAÇÕES UTILIZADO PARA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS RAÍZES DE MACA.

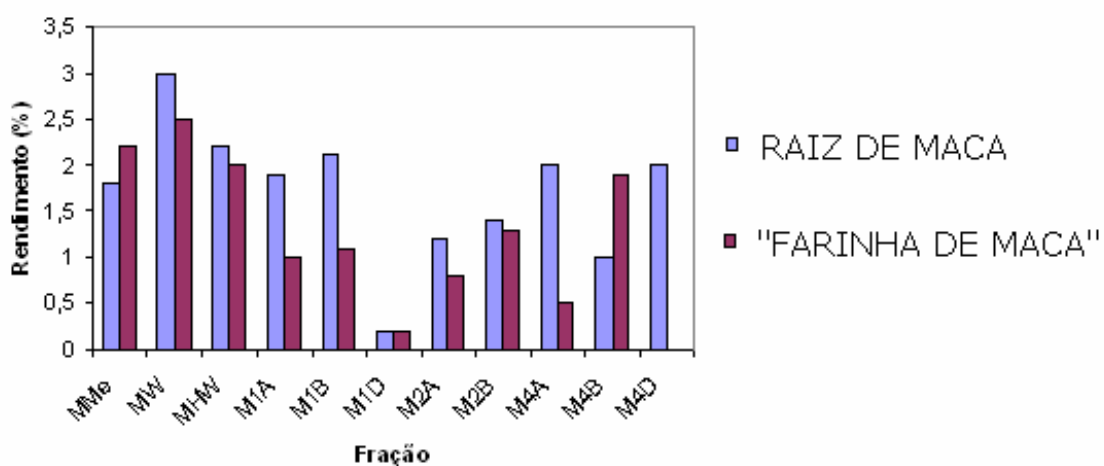
Para as extrações das raízes de maca, além da extração com NaOH 1M, durante a diálise do material da extração com NaOH 4M também observou-se a formação de um precipitado que foi denominado MR4D.

Na tabela 8 estão mostrados os rendimentos das frações obtidas a partir das raízes de maca e na figura 18, os rendimentos destas frações são comparados com aqueles obtidos a partir da “farinha de maca”.

**TABELA 8.** RENDIMENTO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DA RAIZ DE MACA.

Frações	Rendimento <sup>a</sup> % (m/m)
MRMe	1,8
MRW	3,0
MRHW	2,2
MR1A	1,9
MR1B	2,1
MR1D	0,2
MR2A	1,2
MR2B	1,4
MR4A	2,0
MR4B	1,0
MR4D	2,0

<sup>a</sup> Em relação as raízes de maca moídas e deslipidificadas.



**FIGURA 18.** COMPARAÇÃO DOS RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DAS RAÍZES E DA “FARINHA DE MACA”.

Os rendimentos das frações aquosas obtidas das raízes e da “farinha de maca” foram semelhantes, entretanto nas extrações alcalinas foram observadas diferenças maiores. Em geral, o rendimento das frações alcalinas provenientes das raízes de maca foi superior ao obtido a partir da “farinha de maca”. As frações obtidas com NaOH 1M (MR1A e MR1B) apresentaram o dobro do rendimento das respectivas

frações obtidas da “farinha de maca” e a fração MR4A, obtida com NaOH 4M apresentou um rendimento quatro vezes maior que a equivalente MF4A.

A fração de MR4B apresentou metade do rendimento da fração MF4M, entretanto quando se considera o total de polissacarídeos extraídos com NaOH 4M, o rendimento a partir das raízes foi 2,1 vezes superior ao obtido para a “farinha de maca”.

Shiga, Lajolo e Filisetti (2004) estudaram as mudanças na parede celular de feijão após o armazenamento durante 24 meses a temperatura ambiente e observaram que a quantidade de material solúvel em água praticamente não foi alterada. Entretanto, os autores observaram que a quantidade de material extraído com NaOH 4M apresentou um pequeno aumento após o armazenamento dos feijões.

As diferenças observadas podem ser devidas a alterações que ocorrem durante o armazenamento do material ou ainda podem ser devidas a diferenças durante o processamento pós-colheita, tais como o tempo e intensidade de exposição ao sol durante a secagem. Graefe *et al.* (2004) avaliaram os efeitos do processamento pós-colheita sobre os fruto-oligossacarídeos das raízes de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) e observaram que a exposição ao sol por seis dias diminuía os níveis de fruto-oligossacarídeos.

A composição monossacarídica das frações obtidas a partir das extrações das raízes de maca está indicada na tabela 9.

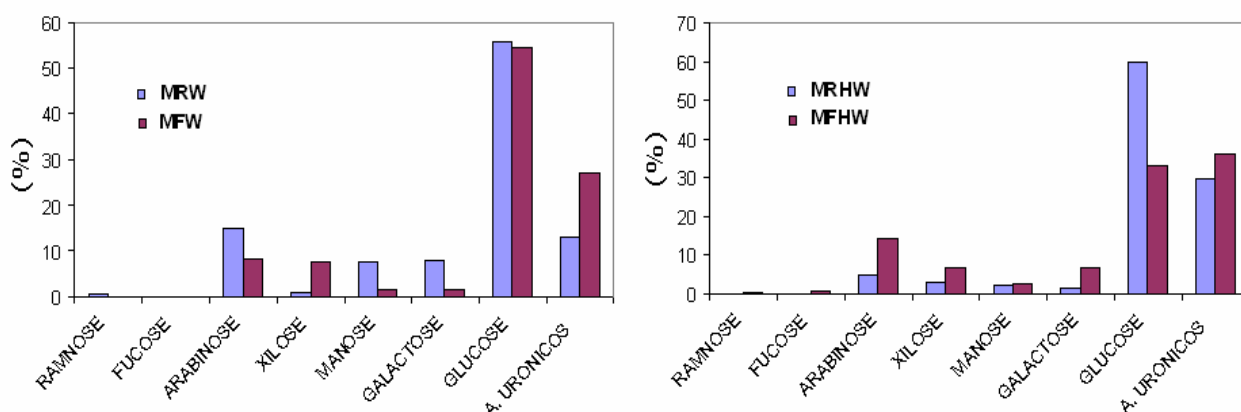
**TABELA 9.** COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA RAIZ DE MACA.

AMOSTRA	MONOSSACARÍDEOS <sup>a</sup>							
	RAMNOSE	FUCOSE	ARABINOSE	XILOSE	MANOSE	GALACTOSE	GLUCOSE	A. URONICOS <sup>b</sup>
MRMe	3,0	0,0	17,2	2,8	15,4	12,4	28,8	20,6
MRW	0,6	0,0	14,8	0,7	7,5	7,8	55,8	12,8
MRHW	0,0	0,0	4,6	2,8	2,3	1,6	59,5	29,3
MR1A	0,8	0,7	18,6	11,1	2,0	3,8	58,1	5,1
MR1B	0,7	0,7	31,0	7,9	1,9	8,5	42,3	6,9
MR1D	7,6	0,5	58,6	6,4	3,0	8,8	7,3	7,9
MR2A	1,0	1,2	37,5	9,0	3,4	10,4	30,4	7,1
MR2B	0,5	6,1	8,8	32,1	6,0	15,2	23,9	7,4
MR4A	0,4	0,5	17,6	23,5	3,4	5,1	44,0	5,5
MR4B	0,5	2,2	15,3	13,4	20,2	16,8	20,1	11,6
MR4D	0,7	0,9	35,8	16,1	5,7	14,3	18,7	7,9

<sup>a</sup> Determinado por GLC.

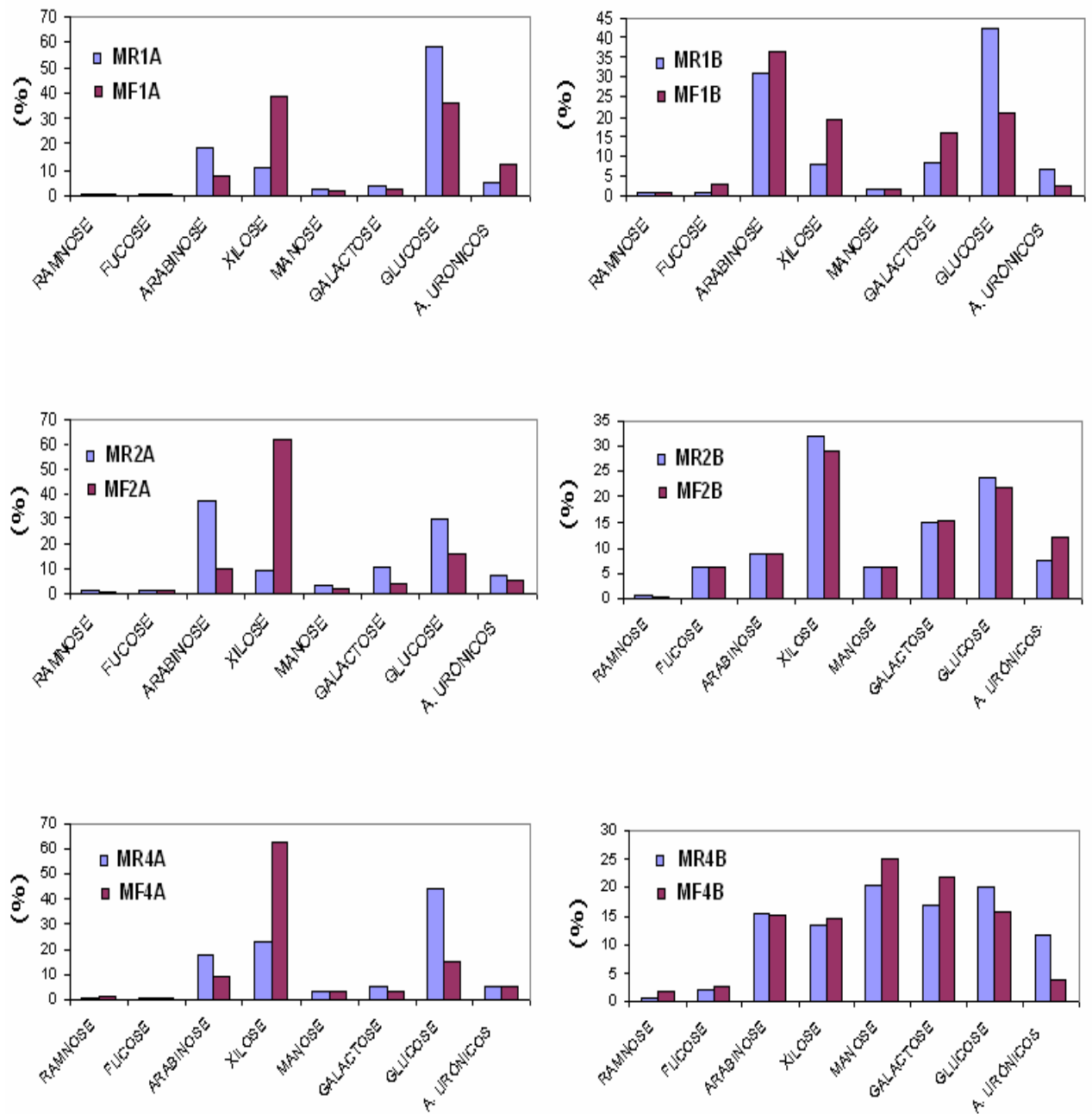
<sup>b</sup> Determinado por método colorimétrico.

Comparando-se a composição das frações obtidas das raízes com àquelas da “farinha de maca” observa-se que as frações aquosas apresentaram-se semelhantes (figura 19). Na fração aquosa obtida a quente das raízes observa-se um maior conteúdo de glucose quando comparada a “farinha de maca”. Por outro lado, na mesma fração da “farinha de maca” há uma maior extração de polímeros contendo xilose e arabinose comparada ao extrato obtido da raiz. Um percentual bem maior de xilose e de ácidos urônicos é observado para a fração MFW quando comparada a fração equivalente obtida das raízes (MRW).



**FIGURA 19.** COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES AQUOSAS OBTIDAS A PARTIR DAS RAÍZES E DA “FARINHA DE MACA”.

Na figura 20 são comparadas as composições monossacarídicas das hemiceluloses A e B obtidas com NaOH 1M, 2M e 4M.



**FIGURA 20.** COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ALCALINAS OBTIDAS A PARTIR DAS RAÍZES E DA “FARINHA DE MACA”.

Nas frações alcalinas também se observa uma maior extração de Xyl nas frações de hemicelulose A obtidas da “farinha de maca” em comparação as frações obtidas das raízes. Assim como observado para as extrações aquosas, uma maior quantidade de glucose foi observada para as frações obtidas a partir das raízes. Estes resultados sugerem que durante os processos de secagem e armazenamento podem ocorrer alterações na quantidade, estrutura e/ou massa molar dos polissacarídeos, as quais afetam a solubilidade dos polissacarídeos. As possíveis modificações que podem ocorrer nos polissacarídeos durante o processamento pós-colheita poderiam alterar não só os polímeros individualmente, mas também poderiam afetar o grau de associação intermolecular e consequentemente a sua solubilidade.

### 5.3. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INSETICIDA DE EXTRATOS DA “FARINHA DE MACA” (*Lepidium meyenii*) CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*.

Os bioensaios de atividade larvicida foram realizados no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária do Departamento de Zoologia da UFPR sob a orientação do professor Mário Navarro.

Foram testadas soluções de 0,12; 0,25; 0,60; 0,85 e 1,00% do extrato etanólico. Na tabela 10 observamos o resultado, referente a quantidade de larvas vivas (V) e mortas (M) quando utilizadas diferentes concentrações do extrato etanólico. Os dados se referem a dois testes realizados em dias diferentes.

Embora o teste 1 tenha mostrado que a utilização do extrato etanólico da “farinha de maca” resulte em altas taxas de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*, de acordo com a tabela 10, para a maior parte das concentrações testadas os dados não foram reprodutíveis. Novos testes precisam ser feitos para confirmar os resultados.

**TABELA 10.** QUANTIDADE DE LARVAS DE *Aedes aegypti* VIVAS (V) E MORTAS (M) APÓS TRATAMENTO COM EXTRATO ETANÓLICO DA “FARINHA DE MACA” EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Concentração	Teste 1 <sup>a</sup>		Teste 2 <sup>b</sup>		TOTAL		
	V	M	V	M	V	M	Total
0,12%	9	71	78	2	87	73	160
0,25%	8	72	81	1	89	73	162
0,60%	10	70	32	47	42	117	159
0,85%	0	75	1	78	1	153	154
1,00%	0	20	25	73	25	93	118
Controle	80	0	77	3	157	3	160

<sup>a</sup>Realizado em 10/10/2008

<sup>b</sup>Realizado em 24/11/2008

V= larvas vivas, M= larvas mortas

Na tabela 11 estão mostrados os resultados referentes aos testes de atividade larvicida realizados com o extrato aquoso obtido da “farinha de maca” nas concentrações 0,12; 0,25; 0,60; 0,85 e 1,00%.

**TABELA 11.** QUANTIDADE DE LARVAS DE *Aedes aegypti* VIVAS (V) E MORTAS (M) APÓS TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DA “FARINHA DE MACA” EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Concentração	Teste 1 <sup>a</sup>		Teste 2 <sup>b</sup>		TOTAL		
	V	M	V	M	V	M	Total
0,12%	14	66	76	3	90	69	159
0,25%	6	64	76	1	82	65	147
0,60%	0	80	74	9	74	89	163
0,85%	0	80	44	34	44	114	158
1,00%	2	78	39	43	41	121	162
Controle	80	0	70	6	150	6	156

<sup>a</sup>Realizado em 10/10/2008

<sup>b</sup>Realizado em 24/11/2008

V= larvas vivas, M= larvas mortas

A tabela 12 mostra que os extratos aquosos obtidos da “farinha de maca” também apresentaram ação larvicida contra *Aedes aegypti*. As concentrações letais



CL<sub>2</sub>, CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub>, CL<sub>95</sub>, CL<sub>98</sub> e CL<sub>99</sub> do extrato aquoso foram calculadas pelo programa Basic-Probit (nível de confiança 0,95) e estão mostradas na tabela 12.

**TABELA 12.** CONCENTRAÇÃO LETAL (g%) DO EXTRATO AQUOSO DA “FARINHA DE MACA” PARA LARVAS DE *Aedes aegypti*.

CL <sup>a</sup>	Nível de confiança	Intervalo de confiança			
2 = 0,00247	0,95	0,00036	< CL >	0,00748	
50 = 0,25942	0,95	0,18986	< CL >	0,33113	
90 = 4,72915	0,95	2,67134	< CL >	12,44341	
95 = 10,77272	0,95	5,15335	< CL >	38,18179	
98 = 27,20316	0,95	10,74579	< CL >	135,40850	
99 = 50,43846	0,95	17,51296	< CL >	315,28390	

<sup>a</sup> Letal concentration

De acordo com a análise as concentrações letais CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub> e intervalos de confiança foram 0,26 % (0,19 - 0,33) e 10,77 % (5,15 - 38,18) do extrato, respectivamente, com  $\chi^2$  4,39. Para os valores de CL<sub>98</sub> e CL<sub>99</sub> os intervalos de confiança não foram adequados devido à amplitude obtida. Embora o extrato aquoso da “farinha de maca” tenha apresentado atividade larvicida contra *Aedes aegypti*, os valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub> obtidos são inferiores aos descritos por Wandscheer et al. (2004) que utilizaram extratos etanólicos de *Melia azedarach* e *Azadirachta indica*.

Os resultados sugerem que os extratos de maca (*Lepidium meyenii*) poderiam ter potencial inseticida para o controle populacional de larvas de *Aedes aegypti*, entretanto experimentos adicionais são necessários para confirmar esta possibilidade.

## 6. CONCLUSÕES

A partir das extrações aquosas da farinha de maca (*Lepidium meyenii*) inativada, deslipidificada e livre de amido foram obtidas misturas de polissacarídeos cuja composição sugere a presença de glucanas e polissacarídeos ácidos.

A fração alcalina obtida com NaOH 2M correspondente a hemicelulose B apresentou uma composição monossacarídica característica de uma mistura de xiloglucana estrutural e polissacarídeos ácidos, além da presença de proteína. Esta fração foi fracionada por cromatografia de troca iônica resultando em uma fração neutra e livre de proteína e uma fração ácida, heterogênea e possivelmente ligada a proteína. Análises de RMN-<sup>13</sup>C e metilação indicam que a fração neutra contém uma xiloglucana estrutural, identificada pela primeira vez em raízes.

A comparação da composição das frações obtidas por extrações aquosas e alcalinas do produto comercial conhecido como “farinha de maca” e das raízes frescas após secagem e moagem mostrou algumas diferenças sugerindo a ocorrência de mudanças durante o processamento pós-colheita que afetam a solubilidade dos polímeros.

Os resultados preliminares dos testes com extratos aquosos e etanólicos obtidos da “farinha de maca” indicaram que os extratos de maca poderiam ter potencial inseticida para o controle populacional de larvas de *Aedes aegypti*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.A. Complete acid hydrolysis. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v.5, p.269-276, 1965.

ALBERSHEIM, P. The walls of growing plant cells. **Scient. Am.**, v. 232, p. 80-94, 1975.

ALBERSHEIM, P. *et al.* An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.). **Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, v. 14, p. 47-55, 1996.

ALZAMORA, L. *et al.*, Efecto de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sobre la producción de óxido nítrico *in vitro* **Rev. peru. biol. número especial 13(3)**: 215 – 217, 2007.

AMMERMAN, L. U.; QUIRÓS, C. F. Glucosinolate conten in maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. **Econ. Bot.** 55, 225-262, 2001.

ARIAS-RAMIREZ, A. R., Biotecnología y metabolitos secundários em *Lepidium peruvianum chacón*. "maca". Tesis para optar el título profesional de biólogo, por la **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**. Lima – Perú, 2002.

ASSINEWE, V. A. *et al.*, Extractable polysaccharides of *Panax quinquefolius* L. (North American ginseng) root stimulate TNF $\alpha$  production by alveolar macrophages **Phytomedicine** 9: 398–404, 2002.

AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, p. 143, 1997.

AYAMBO-SAAVEDRA, L. D. Optimización del proceso de extracción etanólica de *Lepidium peruvianum* Chacón, "maca". Tesis Para optar el Título Profesional de químico farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 2006.

BAKRY, N.; METCALF, R.L.; FUKUTO, T.R., 1968. Organothiocyantes as insecticides and carbamate synergists. **J. Econ. Entomol.** 61, 1303– 1309, 1968.

BIERMANN, C.J.; MCGINNIS, G.D. Analysis of Carbohydrates by GLC and MS. Florida: **CRC Press**, p. 27-41, 1989.

BUCHALA, A. J. *et al.*, Xyloglucans in different types of cotton (*Gossypium* sp.) cells. **Acta Bot. Neerl.**, v. 42, n. 2, 213-219, 1993.

BUSATO, A. P.; VARGAS-RECHIA, C. G.; REICHER, F. Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, Volume 58, Issue 3, Pages 525-531, 2001.

BUSATO, A. P. Xiloglucana fucosilada de folhas de *Hymenaea courbaril* (JATOBÁ), Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências-Bioquímica, 2004.

CAO, W. E. T. *et al.*, Structure of an anti-tumor polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels **Carbohydrate Polymers** 66, 149–159, 2006.

CARPITA, N. C. Structure and biogenesis of the cell wall of grasses. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 47, 445-476, 1996.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J.**, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N.; McCANN, M. The Cell Wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland: Couries Companies, 52-89. 2000.

CHACON R. C. Estudio fotoquímico de *Lepidium meyenii* Walp. Thesis, **University Nac. Mayor de San Marcos**, Lima Perú, 1961.

CHACON DE POPOVICH, G. La maca (*Lepidium peruvianum* Chacón sp. nov.) y su hábitat. **Rev. Per. Biol.** 3(2):169-272, 1990.

CHAMBAT, G.; BARNOUD, F.; JOSELEAU, J-P. Structure of the Primary Cell Walls of Suspension-Cultured *Rosa glauca* Cells. **Plant Physiology** 74:687-693, 1984.

CHUNG, F. *et al.*, Dose-response effects of *Lepidium meyenii* (Maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 98, 143-147. 2005.

CICERO, A. F. G.; BANDIERI, E.; ARLETTI, R. *Lepidium meyenii* Walp. Improves sexual behaviour in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. **Journal of ethnopharmacology**. 75, 225-229, 2001.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p.209-217, 1984.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. **American Society of Plant Physiologists**, p: 1250-1318, 2000.

CUI, B.; *et al.*, Imidazole alkaloids from *Lepidium meyenii*. **J. Nat. Prod.** 66, 1101–1103, 2003.

CUI, H. *et al.*, Structure and chain conformation of a (1 → 6)- $\alpha$ -D-glucan from the root of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and the antioxidant activity of its sulfated derivative. **Carbohydrate Polymers**, Volume 74, Issue 4, Pages 771-778, 2008.

CUTILLAS-ITURRALDE A., *et al.*, Xyloglucan from persimmon fruit cell walls. **Phytochemistry**, v. 48, 607-610, 1998.

DIALLO, D. *et al.*, Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. Et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity **Journal of Ethnopharmacology** 74, 159–171, 2001.

DINI, A. *et al.*, Chemical Composition of *Lepidium meyenii*, **Food Chemistry** 49, 347-349, 1994.

DINI, I.; TENORE, G. C.; DINI, A. Glucosinolates from Maca (*Lepidium meyenii*). **Biochemical Systematics and Ecology**. 30, p. 1087-1090, 2002.

DONG, Q. *et al.*, Structural features of a heteroxylan from *Sophora subprostrata* roots **Phytochemistry**. 50, 81-84, 1999.

DUBOIS, M. *et al.*, Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Biochemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DULMAGE H.T., *et al.*, Guidelines for Production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*, UNDP/World Bank/WHO, Steering Committee to Biological Control of Vectors, **Geneva**, 59 pp, 1990.

FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C.; CARPITA, N.C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v.197, p.157-162,1991.

FINNEY D. J. Probit Analysis, # ed. **S. chand & Company Ltd, Ram Nagar**, New Delhi, 333pp., 1981.

FOSKET, D. E. Characteristics of plant cells that are important in development. In: **Plant Growth and Development. A molecular Approach**. Ed: Academic Press. San Diego, p.198-273, 1994.

FRY, S.C. The structure and functions of xyloglucan. **J. Exp. Bot.**, v. 40, n. 211, p. 1-11, 1989.

GHOSH, P., *et al.*, Polysaccharides from *Sesamum indicum* meal: Isolation and structural features. **Food Chemistry**. 90, 719–726, 2005.

GONZALES, G.F. *et al.*, Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) roots on spermatogenesis of male rats. **Asian J Androl** 3:231–233., 2001.

GONZALES, C. *et al.*, Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 3:5, 2005a.

GONZALES, C. *et al.*, Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats. **Journal of ethnopharmacological**. 103, 448-454, 2005b.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.** 128, 119-132, 1984.

GRAEFE, S., *et al.*, Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. **Field Crops Research**. 86, 157–165, 2004.

GUO, Y. *et al.*, Effects of a pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. on interleukin 6 production of murine B cells and B cell lines. **Immunopharmacology** 49\_2000.307–316, 2000.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annu. Rev. Plant Physiology. Plant Mol. Biol.**, v. 40, p. 139-168, 1989.

KEEGSTRA, K. *et al.*, Structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on interconnections of the macromolecular components. **Plant Physiol.**, v. 51, p. 188-197, 1973.

HROMÁDKOVÁ, Z.; EBRINGEROVÁ, A.; VALACHOVÍ, P. Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian (*Valeriana officinalis* L.). **Ultrasonics Sonochemistry**, Volume 9, Issue 1, Pages 37-44, 2002.

JOSELEAU, J-P.; CHAMBAT, G. Structure of the Primary Cell Walls of Suspension-Cultured *Rosa glauca* Cells. **Plant Physiol.** 74, 694-700, 1984.

LAGARDA, M. J.; GARCIA-LLATAS, G.; FARRÉ, R. Analysis of phytosterol in foods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical**, 41, 1486-1496, 2006.

LEE, K. *et al.*, Activity-guided fractionation of phytochemicals of maca meal, their antioxidant activities and effects on growth, feed utilization and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) juveniles. **Aquaculture**, 244 293-301, 2004.

LI, G.; AMMERMAN, U.; QUIRÓS, C. F. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products, **Econ Bot**; 55:255-262, 2001.

LIU, Z.; YANG, Z.; ZHU, M.; HUO, J. Estrogenicity of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) and its effect on estrogen receptor level in human breast cancer mcf-7 cells. **Wei Shen Yan Jiu**. 2001; 30:77-80.

LUNA, J. E. D. Dinâmica do controle biológico de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 Por *Bacillus thuringiensis* var *israelenses*. Dissertação apresentada como requisito parcial á obtenção do grau de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de concentração em Entomologia, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2004.

MARIN-BRAVO, M. Histología de la maca, *Lepidium meyenii walpers* (Brassicaceae). **rev. peru. biol.** **10(1)** 101-108, 2003.

McCANN, M. C. *et al.*, Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall. **Phytochemistry**, Volume 57, Issue 6, Pages 811-821, 2001.

MUMMERHOFF, K. *et al.*, Systematic implications of chloroplast DNA variation in *Lepidium* sections Cardamon, Lepiocardamon and Lepia (Brassicaceae). **Plant Systematics and Evolution**. 196, 75-88, 1995.

MUMMENHOFF, K.; BRÜGGEMANN, H.; BOWMAN, J. L. **Am. J. Bot.** 88, 2051–2063, 2001.

NATIONAL RESERCH COUNCIL. Lost Crops of the Incas: Little-known plans of the Andes with Promise for Worldwide cultivation. **National Academy Press**. Washington, D.C., 1989.

OHKAWA, H. *et al.*, Enzymic mechanisms and toxicological significance of hydrogen cyanide liberation from various organothiocyantes and organonitriles in mice and houseflies. **Pestic. Biochem. Physiol.** 2 (1), 95–112, 1972.

PAULET, P. G.; CARRASCO, R. R.; SÁNCHEZ, C. V. Almidón y fibra dietética en alimentos. Experiencia de Perú. Carbohidratos en Alimentos Iberoamericanos. **Edusp-Editora da Universidade de São Paulo**. 607-633, 2006.

PEREIRA, B. M. R. *et al.*, Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharides of *Periandra mediterranea* **Phytochemistry**. 54, 409-413, 2000.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.*, which is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, v. 83, p. 346-356, 1977.



PETKOWICZ, C. L. O.; RECHIA, C.G.V.; BUSATO, A.P.; REICHER, F. Xiloglucanas: estrutura, propriedades e aplicações. In. **Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos**. Ed. F.M. Lajolo; E.W. Menezes. p.127-147. Edusp, São Paulo, 2006.

PIACENTE, S. *et al.*, Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp.). **J Agric Food Chem**. 2002; 50:5621-5.

PIZZA, C. *et al.*, Qualit  Nutricionali dei Tuberi Andini. En la maca “Il Ginseng Delle Ande” E. Altre Radici E. Tuberi Andini. Contributo alla conoscenza e Valorizzazione della risorse vegetali e animali dell’America Latina. **Quaderni IILA. Serie Scienza. IILA**. Roma. 1998.

PROPHIRO, J. S. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e de *Aedes albopictus* (SKUSE, 1894) (Diptera: culicidae) a organofosforado e atividade inseticida de produtos de origem botânica. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,  rea de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas. 2008.

QUIROS, C. Genética de la maca y especies relacionadas. Curso taller internacional sobre Maca. **Universidad Nacional Agraria La Molina**. Lima – Perú, 1999.

QUIROS C.; ALIAGA R., Maca *Lepidium meyenii* Walpers An Andean roots and tubers: ahipa, arracacha, maca and yac n. **IPIGRI**. Roma, 1996.

RAY, B., *et al.*, Structural investigation of hemicellulosic polysaccharides from *Argania spinosa*: characterisation of a novel xyloglucan motif. **Carbohydrate Research**. 339, 201–208, 2004.

REDGWELL, R., *et al.*, Dietary fibre in cocoa shell: characterisation of component Polysaccharides. **Food Chemistry** 81, 103–112, 2003.

REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: **Structural Carbohydrates**. in DEY, P. M. e HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. San Diego: academic press Ltda., p. 205-235, 1997.

RONCEROS, G. *et al.*, Eficacia de la maca fresca (*Lepidium meyenii walp*) en el incremento del rendimiento físico de deportistas en altura, **Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos** 66(4) 269-273, 2005.

RONDAN-SANABRIA G. G. Caracterização parcial de carboidrases, morfologia do grão de amido e composição centesimal de raízes de maca (*Lepidium meyenii* Walpers). Dissertação apresentada para optar o grau de mestre na Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2005.

RONDAN-SANABRIA G. G.; FINARDI-FILHO, F., Physical–chemical and functional properties of maca root starch (*Lepidium meyenii Walpers*) **Food Chemistry** xxx (2008) xxx–xxx

RUBIO, J.; *et al.*, Aqueous and hydroalcoholic extracts of Black Maca (*Lepidium meyenii*) improve scopolamine-induced memory impairment in mice. **Food and Chemical Toxicology**. 45, 1882-1890, 2007.

SAEMAN, J. F. *et al.*, Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tappi Journal**, v. 37, p. 336-343, 1954.

SALDAÑA C.; CÓRDOVA P.; VARGAS V., Utilización de *Lepidium peruvianum* Maca, como medio decultivo para el crecimiento de *Trypanosoma cruzi*, **Rev Peru Med Exp Salud Publica** 23(2), 2006.

SANDOVAL, M. *et al.*, Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). **Food Chemistry**. 79 207-213, 2001.

SCALBERT, A. *et al.*, Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. **Phytochemistry**, v. 24, p. 1359-1364, 1985.

SCHINDLER, T. M. **The view of primary cell wall**. Z. Pflanzenernähr. Bodenk., v. 161, p. 499-508, 1998.

SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Complex pectins: structure elucidation using enzymes. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.), **Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, v. 14, p. 3-19, 1996.

SCHÜLER, G. *et al.*, Coronalon: a powerful tool in plant stress physiology **FEBS Letters**. 563, 17-22, 2004.

SCOTT, J.E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. *Meth. Carbohydr. Chem.*, v.5, p.38-44, 1965.

SHI, L.; FU, Y.; CHEN, K. A novel water-soluble  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glucan from the root of *Cudrania tricuspidata*. **Fitoterapia**, Volume 78, Issue 4, Pages 298-30, 2007.

SHIGA, T.; LAJOLO, F. M.; FILISETTI, T. M. C. C. Changes in the cell wall polysaccharides during storage and hardening of beans. **Food Chemistry**. 84, 53–64, 2004.

SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins. **Plant Cell**, v. 5, p. 9-23, 1993.

SLONEKER, J.H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 6, p. 20-24, 1972.

SOLIS, J.; MEDRANO, G.; GHISLAIN, M. Inhibitory effect of a defensin gene from the Andean crop maca (*Lepidium meyenii*) against *Phytophthora infestans*. **Journal of plant physiology published by Elsevier inc.** 2006.

SONODA, Y., *et al.*, Stimulation of interleukin-8 production by acidic polysaccharides from the root of *Panax ginseng*. **Immunopharmacology** 38, 287–294, 1998.

TALMADGE, K. W. *et al.*, Structure of plant cell walls. I. The macromolecular components of the walls of suspension cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. **Plant Physiol.** 51, 158-173, 1973.

TELLEZ, M. R. *et al.*, Composition of essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp). **Phytochemistry**. 61, 149-155, 2002.

TOLEDO, J. *et al.*, Genetic Variability of *Lepidium meyenii* and other Andean *Lepidium* Species (Brassicaceae) Assessed by Molecular Markers. **Annals of Botany** 82, 523-530, 1998.

THUDE, S.; CLASSEN, B. High molecular weight constituents from roots of *Echinea pallida* : An arabinogalactan-protein and arabinan. **Phytochemistry**. 66, 1026-1032, 2005.

VÁLENTOVA, K.; ULRICHOVA, J. Smallanthus Sonchifolius and Lepidium meyenii – prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases. **Biomed. Pap.** 147, 119-130, 2003.

VARNER, J. L.; LIN, L. S. Plant cell architecture. **Cell**, v. 56, p. 231-239, 1989.

VAUGHN, D. W. Testing of a dengue 2 live-attenuated vaccine (strain 16681 PDK 53) in ten American volunteers. **vaccine**, Vol. 14, No. 4, pp. 329-336, 1996.

VINCKEN, J. P.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. The effect of xyloglucans on the degradation of cell-wall-embedded cellulose by the combined action of cellobiohydrolase and endoglucanases from *Trichoderma viride*. **Plant Physiol.**, v. 104, 99-107, 1994.

WANDSCHEER, C. B. *et al.*, Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Toxicon**, 44, 829-35, 2004.

WANG, Y. *et al.*, Maca: An Andean crop with multi-pharmacological functions. **Food Research International**. 40, 783-792, 2007.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, 2, 65-68, 1963a

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.** 2, 211, 1963b.

XU, H. *et al.*, Isolation and characterization of an anti-complementary polysaccharide D3-S1 from the roots of *Bupleurum smithii*. **International Immunopharmacology**. 7. 175–182, 2007.

YANG, T. *et al.*, Immunomodulatory activity of polysaccharide isolated from *Angelica sinensis* **International Journal of Biological Macromolecules**. 39, 179–184, 2006.

YUCRA, S. *et al.*, Effect of different fractions from hydroalcoholic extract of Black Maca (*Lepidium meyenii*) on testicular function in adult male rats. **American Society for Reproductive Medicine, published by Elsevier inc.**, 2007.

ZHANG, Y. *et al.*, Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. On osteoporosis in ovariectomized rat. **Journal of Ethnopharmacology** 105, 274-279, 2006.

ZHENG, B. L. *et al.*, Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii*, on sexual behavior in mice and rats. **Urology**, 55, 598-602, 2000.

ZHENG, B. L.; KHIM, C. H.; HE, K., *et al.*: A process for the isolation and purification of *Lepidium meyenii*. **Patent pending**, 1999.

ZSOLNAI, T. Insecticidal action of thiol reagents. I. Thiocyanate, isothiocyanate, and potential isothiocyanate complexes. **Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.** 9 (1), 125–141. 1974.